Aus der II. Inneren Abteilung
des Städtischen Krankenhauses Berlin-Neukölln
Chefärztin: Prof. Dr. Irene Boll

DIE WIRKUNG VON SERUM EINER PATIENTIN MIT THROMBOZYTHÄMIE AUF DIE PROLIFERATION DES MENSCHLICHEN KNOCHENMARKS IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Franz Xaver Bartenschlager
aus Memmingen

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549614_0052

Druck: Copy-Center in Dahlem
Ladenbergstraße 2-4
1000 Berlin 33
Tel. 831 40 25

Aus der II. Inneren Abteilung des Städtischen
Krankenhauses Berlin-Neukölln
Chefärztin Prof. Dr. Irene Boll

DIE WIRKUNG VON SERUM EINER PATIENTIN MIT THROMBOZYTHÄMIE AUF DIE PROLIFERATION DES MENSCHLICHEN KNOCHENMARKS IN VITRO

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Franz Xaver Bartenschlager
aus Memmingen

Referent: Prof. Dr. med. Irene Boll

Korreferent: Prof.Dr.med. R.Thom

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 26.3.1986

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	4
	1. In vivo-Versuche	4
	a) Eigenschaften von Thrombopoetin	5
	b) Produktionsort von Thrombopoetin	5
	c) Trombopoetin-Wirkung und -Regulation	6
	2. In vitro-Versuche	7
	a) Quellen für megakaryocyte colony-stimulating-factor (Meg-CSF)	7
	b) Wirkung und Regulation von Meg-CSF	8
	3. Zwei-Faktoren-Regulationsmodell der Megakaryopoese	8
	4. Thrombozythämie - Begriffsbestimmung und Pathogenese	9
	5. Fragestellung	10
II.	METHODE	11
III.	MATERIAL	17
IV.	ERGEBNISSE	24
	Versuch 1	24
	Versuch 2	31
	Versuch 3	38
	Versuch 4	45
	Versuch 5	52
V.	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	59
VI.	DISKUSSION	73
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	79
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	80
IX.	GLOSSAR	94

I. EINLEITUNG

Die bemerkenswerte Konstanz der Thrombozytenzahlen des peripheren Blutes ließ einen der Erythropoese ähnlichen Regulationsmechanismus vermuten. Unterschiedliche Versuchsmethoden zum Nachweis von humoralen Regelsubstanzen der Megakaryopoese kamen zur Anwendung.

1. In-vivo-Versuche

Kelemen 1958 (46) und nach ihm viele weitere Untersucher injizierten in Versuchstiere Plasma oder Urin, entweder von gesunden Patienten (47, 56, 82, 94, 95) oder von solchen mit Thrombozytose bzw. Thrombozythämie (46, 57, 65) oder Thrombopenie (20, 62, 74, 89, 94) und nahmen die dadurch erfolgte Änderung der peripheren Plättchenzahl zum Maßstab für die Aktivität der in der Probe enthaltenen thrombopoesestimulierenden Substanz, die als Thrombopoetin bezeichnet wurde (Kelemen 1958). Die teilweise sehr widersprüchlichen Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden u.a. mit dem unspezifischen Einfluß z.B. von Fremdeiweißen auf die Megakaryopoese (20) und den erheblichen physiologischen Schwankungen der Plättchenzahl bei Versuchstieren erklärt (77). Da überdies die Thrombozytenkonzentration eine Resultante von Produktion und Destruktion darstellt und somit nicht notwendigerweise die Produktionsrate widerspiegelt, war erst durch die Entwicklung von Radioisotopenassays ein weiterer Aufschluß über die Regulation der Thrombopoese zu erwarten.

Beim Radioisotopenassay werden die den Versuchstieren nach Gabe eines bestimmten Plasmas injizierten radioaktiven Substanzen ^{75}SeM oder $Na_2\,^{35}SO_4$ in das Zytoplasma von reifenden Megakaryozyten (Mk) eingebaut und erscheinen danach in den freigesetzten Thrombozyten, wobei zum Zeitpunkt der Injektion bereits zirkulierende Plättchen nicht markiert werden (50, 80). Die Messung der Plättchenradioaktivität erlaubt dann eine Quantifizierung der Thrombopoetinwirkung.

Plasma von Spendertieren deren Thrombopoese durch Anti-Plättchenserum stimuliert war, führte beim Empfänger zu einem deutlichen Anstieg der gemessenen Thrombozytenradioaktivität nach Radioisotopengabe (15, 23, 24, 72, 78, 80, 90). Das Gegenteil bewirkte Plasma von Tieren mit plättchentransfusionsinduzierter Thrombozytose (23, 90). Eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen dem Volumen des verabreichten plättchenreichen bzw. -armen Plasmas und der gemessenen Radioaktivität der freigesetzten Blutplättchen konnte nachgewiesen werden (51). Diese Versuche bestätigten die Hypothese einer humoralen Kontrolle der Megakaryopoese durch einen negativen Feedbackmechanismus.

a) Eigenschaften von Thrombopoetin (TPO)

TPO ist ein nicht dialysierbares Glykoprotein und reichert sich bei der Chromatographie in der Albumin- und ß-Globulin-Fraktion an (16, 26). Die Angaben zur Stabilität variieren zwischen 10 Tagen (keine Angaben zur Lagerungstemperatur) (16), 1 - 3 Monaten bei -10° C (80) und 3 - 6 Monaten bei -70° C (26). Das Molekulargewicht wird von Dassin (16) mit 48000 Daltons angegeben. Eine chemische Reindarstellung von TPO ist bis heute nicht gelungen. Durch verschiedene chromatographische Reinigungsschritte konnte jedoch eine Anreicherung bis auf das 4800-fache seiner ursprünglichen Plasmakonzentration erzielt werden (53). Evatt wies 1979 (26) in teilweise gereinigtem Thrombopoetin drei verschiedene Fraktionen nach, die alle zu einem gesteigerten Einbau von ^{75}SeM in Thrombozyten führten. Möglicherweise gibt es mehrere Faktoren, die zur Zeit unter dem Begriff TPO zusammengefaßt werden und verschiedene Teilschritte der Thrombopoese regulieren.

b) Produktionsort von Thrombopoetin

Eine sichere Lokalisation des Produktionsortes von TPO ist bis heute nicht gelungen. Die klinische Beobachtung, daß bis zu 50 % der Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen eine

Thrombozytopenie aufzeigen (84), wies jedoch auf die Niere. Bestätigt wurde diese Vermutung durch Versuche von Mc Donald, der zeigte, daß Plasma von bilateral nephrekto mierten Versuchstieren, denen Antiplättchenserum (APS) verabreicht wurde, im Gegensatz zu solchem von unbehandelten Tieren nach Gabe von APS, keine TPO-Wirkung entfalten konnte. Diese wurde im Radioisotopenassay (66) und durch Veränderung der Zahl von unreifen Megakaryozyten (69) bestimmt. Einen weiteren Hinweis für die Niere als zumindest einen der Bildungsorte von TPO gab der Nachweis von TSF-Aktivität im Medium einer Kultur von menschlichen embryonalen Nierenzellen (14, 64). Einem Vorschlag von Levin (54) zufolge sollte der Begriff thrombopoesis stimulating factor (TSF) für eine entsprechende Aktivität verwendet werden, die nicht aus Blut, sondern beispielsweise aus Urin oder Zellkulturen gewonnen wird.

c) TPO-Wirkung und -Regulation

Thrombopoetin ist der in vivo wirksame Regulationsfaktor der Thrombo- bzw. Megakaryopoese. Folgende Wirkungen konnten nachgewiesen werden:

- Vermehrung der kleinen unreifen MK (1, 41, 44, 59, 76).
- Zunahme des Endomitoseindexes der MK (32, 33, 76).
- Zunahme der Ploidie der MK (53, 76).
- Zunahme der MK-Größe (21, 32, 68, 76).
- Anstieg der Gesamt-MK-Zahl (11, 33, 68).
- Zunahme der peripheren Plättchenzahl (1, 21, 74, 76, 94).

Plättchentransfusion oder Induktion einer akuten Thrombopenie führt innerhalb weniger Stunden zu reziproken Änderungen der Zahl der kleinen unreifen, wegen ihres Acethylcholinesterasegehaltes bei der Maus anfärbbaren Mk, die auch "small AchE + cells" (SAChE + Zellen) genannt werden (1, 41, 76). Diese diploide Zelle stellt eine Übergangsform zwischen der determinierten Stammzelle (colony forming unit = CFU-M) und den ersten morphologisch identifizierbaren Megakaryoblasten dar (41, 59) und gilt als die am schnellsten reagierende

Zielzelle des Thrombopoetins.

Als Sensor für eine Änderung der Thrombopoetinproduktion gilt nicht die periphere Plättchenkonzentration, sondern die gesamte Thrombozyten-Masse (20).

2. In vitro-Versuche

Mitte der siebziger Jahre gelang die Entwicklung von klonalen in-vitro-assays zur Kultivierung von unreifen Mäuse-Megakaryozyten (70, 71, 73), die aufgrund ihres AChE-Gehaltes färberisch nachgewiesen werden konnten (41). Somit war es möglich, leicht reproduzierbar die Entwicklung von der determinierten Stammzelle oder CFU-M (colony forming unit megakaryocyte) (73) zu den reifen Mk und den Einfluß von Regulationsfaktoren auf diesen Prozeß zu studieren. Nach Einführung immunologischer Nachweismethoden ist inzwischen auch die Identifizierung von in vitro gewachsenen humanen Mk-Kolonien möglich (60). Die Koloniebildung von CFU-M ist von der Anwesenheit zumindest einer stimulierenden Substanz abhängig, die von Hoffman 1981 erstmals als Meg-CSF (megakaryocyte colony-stimulating-factor) bezeichnet wurde (39).

a) Als Quellen für Meg-CSF gelten:

- Konditionierte Medien aus mitogenstimulierten Milzzellkulturen (73).
- Lymphozytenkonditionierte Medien (71).
- Überstand einer Mäuse-Leukämie-Linie WEHI-3-CM (101).
- Erythropoetinhaltige Präparationen (45, 70).
- Serum von Patienten mit hypo- bzw. amegakaryozytärer Thrombopenie (39, 40).
- Serum und Urin von Patienten mit aplastischer Anämie (22, 61).

b) Wirkung und Regulation von Meg-CSF

1981 konnte Hoffman (39) nachweisen, daß Serum von Patienten mit Thrombopenie und erniedrigter Zahl von Knochenmark-Mk im Gegensatz zu solchen mit normalen Megakaryozytenzahlen zu einem deutlichen Anstieg der in-vitro Produktion von Mk-Kolonien führt. Die Zahl der gebildeten Mk-Kolonien war direkt proportional der zugegebenen Menge an Meg-CSF-haltigem Serum (39). Jede Kolonie ging aus einer einzigen CFU-M hervor. Mit dem oben beschriebenen Versuch war die Existenz eines von TPO verschiedenen Regulationsfaktors und seiner Wirkung auf die Proliferation der determinierten Stammzelle der Megakarypoese bewiesen. Die Konzentration von Meg-CSF ist offensichtlich umgekehrt proportional zur Zahl von Knochenmarkmegakaryozyten und nicht abhängig von der peripheren Plättchenzahl oder -masse (39).
Chemische Struktur, Wirkungsweise und Bedeutung der in vitro wirksamen Faktoren für die in vivo ablaufenden Prozesse sind nicht bekannt.

3. Zwei-Faktoren-Regulationsmodell der Megakaryopoese

Die erstmals 1969 von Harker (33) geäußerte Hypothese einer Zwei-Faktoren-Regulation der Megakaryopoese wurde 1982 durch Williams (103) bestätigt. Er fand bei seinen in vitro Versuchen, daß zur optimalen Mk-Koloniebildung Meg-CSF alleine, das eine Proliferation der Vorläuferzellen bewirkt, nicht ausreicht. Dies wurde erst erreicht durch Zugabe einer die Ausreifung beschleunigenden Substanz (chromatographisch gewonnen aus WEHI-3-Medium), die von ihm als 'megakaryocyte potentiator' bezeichnet wurde und in seiner Wirkung dem TPO entspricht. Auch TPO-haltige Präparationen waren ohne Einfluß auf die Zahl der gebildeten Mk-Kolonien (39, 60, 102, 103). Einen weiteren Hinweis für die Richtigkeit der genannten Hypothese geben in vivo Untersuchungen, die bei der Maus nachweisen, daß bereits wenige Stunden nach Induktion einer akuten

Thrombopenie ein Anstieg der SAChE-Zellen (TPO-Wirkung) stattfand (41), während eine Zunahme der CFU-M (Meg-CSF-Wirkung) erst Tage danach beobachtet wurde (11, 52).

Es darf also angenommen werden, daß für die Megakaryopoese zwei Feedback-Regulationsebenen bestehen.
Eine verminderte Mk-Masse ist der Stimulus für eine vermehrte Meg-CSF Produktion, die wiederum eine gesteigerte Mitoserate der Mk-determinierten Stammzelle bewirkt.

Eine verminderte Thrombozytenmasse hat eine gesteigerte TPO-Konzentration zur Folge. Thrombopoetin ist eher für kurzfristig notwendige Änderungen der Thrombozytenproduktionsrate verantwortlich und greift in die Reifungs- und Differenzierungsschritte der Megakaryopoese ein (s. Seite 6).

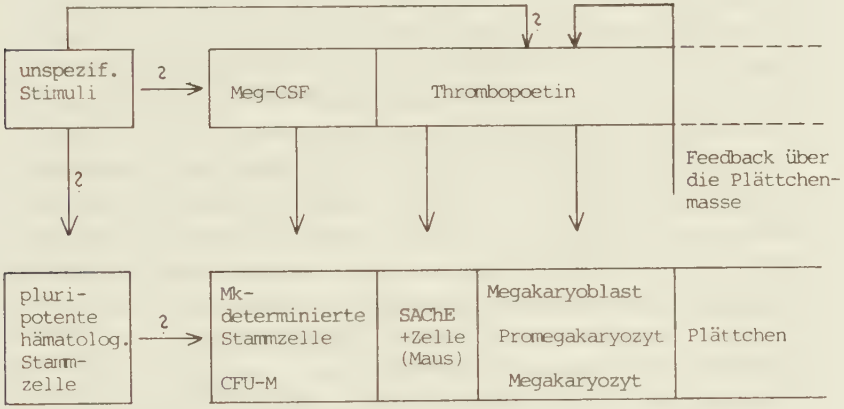


Abb. 1 (modifiziert nach Levin 1982). Schema der Megakaryopoese-Regulation über 2 Faktoren

4. Thrombozythämie - Begriffsbestimmung und Pathogenese

Bei der Beschreibung der primären Thrombozythämie (PT) werden in der Literatur verschiedene Synonyma wie Thrombozythämie (essentielleoder idiopathische),primäre Thrombozytose, megakaryozytäre Leukämie und megakaryozytäre Myelose

verwendet (10, 48, 87). Die PT wird dem myeloproliferativen Syndrom (MPS) zugeordnet (43) und kann gelegentlich dessen übrigen Formen um Jahre vorausgehen (43, 48, 87), so daß manche Autoren die Eigenständigkeit der PT als Krankheitseinheit bezweifeln (43). Pathogenetisch liegt dieser Erkrankung eine klonale neoplastische Entartung der pluripotenten Stammzelle zugrunde (2, 27). Im Knochenmark findet sich eine ausgeprägte Hyperplasie der Thrombopoese mit vermehrtem Vorkommen von Mk-Riesenformen und übersegmentierten Megakaryozyten (10, 48, 87).
Die reaktive Thrombozytose (RT) ist meist nur temporär vorhanden. Eine Differenzierung von der PT nur an Hand der peripheren Plättchenzahl ist nicht möglich; bei beiden Formen können Thrombozytenzahlen über 1000 000/µl vorkommen (48). Im Knochenmarkausstrich unterscheidet sie sich von der durch autonome Proliferation entstandenen Thrombozythämie durch niedrigere Mk-Zahlen und durch das Fehlen von atypischen Formen und Riesen-Megakaryozyten (10, 48, 87). Die RT kommt zum Beispiel vor bei Infekten (18), Tumoren (17, 49, 97), nach Traumen und chirurgischen Eingriffen (18) sowie nach Splenektomie (36). Wenn in dieser Arbeit der Begriff Thrombozytose ohne den Zusatz reaktiv oder primär verwendet wird, so ist damit allgemein eine Thrombozytenerhöhung ohne Berücksichtigung von Ätiologie oder Pathogenese gemeint.

5. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob sich in dem Serum einer Patientin mit Thrombozythämie Regulationsfaktoren befinden, die in vitro unter den Bedingungen der Suspensionskultur zu einer Proliferationsänderung der weißen, roten und insbesondere der Megakaryozytenreihe in nicht pathologisch verändertem Knochenmark führen. Als Kontrolle dienen Kulturen, bei denen AB-Plasma von normalen Blutspendern verwendet wird.

II. METHODE

Nach der von Boll 1975 entwickelten Technik (8) der Suspensionskultur wurden die durch Sternalpunktion gewonnenen Knochenmarkbröckelchen in heparinhaltige (5 bis 10 E/ml) Hank's Lösung (Seromed^{R}, Biochrom KG, Leonorenstr. 2 - 6, 1 Berlin 46) aspiriert und unter sterilen Bedingungen in RPMI-Lösung 1640 (Seromed^{R}, Biochrom KG, Leonorenstr. 2 - 6, 1 Berlin 46) mit dem Zusatz von 200 mg% Glucose und 200 mmol L-Glutamin überführt. Anschließend wurden die in RPMI-Medium schwimmenden Markbröckelchen - um die Zellen zu verteilen - durch Kanülen fallenden Kalibers gepreßt (Nr. 1, Nr. 2 und Nr. 12). Danach erfolgten die Kulturansätze.

Kontrollansatz:

1) 1,8 ml Zellsuspension in RPMI-Medium (verdünnt auf etwa 2000 Zellen/µl).
2) 1,2 ml AB-Plasma
3) 2 Tropfen Strepto-Binotal-Lösung (auf 1 ml Zellsuspension 50 µg Ampicillin und 10 µg Streptomycin).

Thrombozythämieansatz:

1) 1,8 ml Zellsuspension in RPMI-Medium (verdünnt auf etwa 2000 Zellen/µl).
2) 1,2 ml Thrombozythämie-Serum (T.-Serum)
3) 2 Tropfen Strepto-Binotal-Lösung (auf 1 ml Zellsuspension 50 µg Ampicillin und 10 µg Streptomycin).

Thrombozythämieserum und AB-Plasma waren bei -20° C aufbewahrt worden.
Die beiden Kulturansätze (Kontroll- und Thrombozythämieserum-Ansatz getrennt) wurden so in sterile Eppendorf-1,5 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt, daß für jede Stichprobe zwei Gefäße vorhanden waren. Die Gefäße wurden verschlossen und halbliegend bei 37° C bebrütet.
Nach der Inkubation wurden zu den angegebenen Probezeitpunkten

jeweils drei Ausstriche mit Hilfe der Zytozentrifuge (500 U/ min = 22 · g, über 5 Minuten) angefertigt. Auch die O-Stunden Kontrollpräparate (Originale), die Ausgangswerte der Kulturen, wurden vor der Inkubation mit der Zytozentrifuge hergestellt.

A U S W E R T U N G

Pro Patient und Zeiteinheit (O, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 und 11 Tage) wurden jeweils 3 Ausstrichpräparate mit Kontrollserum (AB-Plasma) bzw. Thrombozythämie-Serum angefertigt und zusammen mit den Originalausstrichen nach Pappenheim gefärbt. Von jeder Stichprobe wurden 2000 Zellen und die dazugehörigen Mitosen entsprechend den Kriterien von Boll (5-9) und Heckner (37) differenziert. Insgesamt kamen 84000 Zellen zur Auswertung.

Die rote Reihe wird eingeteilt in:

Proerythroblast	(PE)
basophiler Erythroblast	(bE)
polychromatischer Erythroblast	(pE)
oxyphiler Erythroblast	(oE)
reifer Erythroblast	(rE)

Teilungsfähig sind mit Ausnahme der rE alle roten Vorstufen.

Die weiße Reihe wird eingeteilt in:

Myeloblast	(Mb)
Promyelozyt	(Pr)
neutrophiler Myelozyt	(My)
eosinophiler Myelozyt	(eMy)
basophiler Myelozyt	(bMy)
Metamyelozyt	(MM)
Stabkerniger Granulozyt	(St)
neutrophiler segmentkerniger Granulozyt	(Seg)

eosinophiler segmentkerniger Granulozyt	(eSeg)
basophiler segmentkerniger Granulozyt	(bSeg)
Promonozyt	(Pmo)
Monozyt	(Mo)

Als teilungsfähig gelten die Myeloblasten, Promyelozyten, Myelozyten, Metamyelozyten und Promonozyten.
In den Reifungskurven wurden die neutrophilen, eosinophilen und basophilen Myelozyten bzw. Segmentkernigen der besseren Übersicht wegen zu Myelozyten (My) bzw. Segmentkernigen (Seg) zusammengefaßt:

Die thrombopoetische Reihe wird in folgende Zellarten differenziert (37, 83):

Der Megakaryoblast (Megkbl) hat die Größenordnung eines überdimensionierten Proerythroblasten, ist aber häufig kleiner mit einem Kerndurchmesser ab 7 µm. Sein Charakteristikum ist ein gekerbter Kern oder seine Zwei-Kernigkeit. Die Kernstruktur ist netzig und dunkler als beim PE. Nukleolen sind überwiegend nicht nachweisbar. Das Zytoplasma ist basophil und ohne jeglich azurophile Granulation. Feinste Zytoplasmafortsätze überragen häufig die Zelloberfläche.

Der Promegakaryozyt (Promegk.) ist gekennzeichnet durch eine azurophile Granulation bei teilweise noch vorhandener Zytoplasmabasophile. Typisch sind hochploide Riesenkerne, eine Verschiebung der Kern-Plasmarelation mehr zugunsten des Zytoplasmas und anhaftende Blutplättchen an der Zellperipherie.

Beim Megakaryozyten (Megk.) findet man ausschließlich gefeldertes azurophiles Zytoplasma. Basophile Areale sind nicht mehr erkennbar. Er ist die größte blutbildende Zelle des Knochenmarks mit deutlicher Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Zytoplasmas. Ebenfalls häufig Anlagerung von Thrombozyten am Plasmarand.

An übrigen Zellen wurden ausgewertet:

Lymphozyten	(Ly)
Plasmazellen	(Pz)
Retikulumzellen	(Rz)

Folgende Mitosephasen werden nach Boll (6) unterschieden:

1) Prophase (P):
Die Kernmembran und die Nukleoli sind aufgelöst, die Kernstruktur ist aufgelockert. Die Chromosomen sind noch im festen Spirem angeordnet.

2) frühe Metaphase (fM):
Die Chromosomen sind ungeordnet über die Zelle verstreut und bilden ein lockeres Spirem.

3) späte Metaphase (sM):
Die Chromosomen haben sich verdoppelt und ordnen sich sternförmig zum Monaster bzw. zur Äquatorialplatte an.

4) Anaphase (A):
Die Chromosomenpaare sind zu den Zellpolen auseinandergerückt und es entsteht in der Zelle das Bild des Diasters.

5) Telophase (T):
Die Zelle ist deutlich eingeschnürt. Die Chromosomen liegen in beiden Zellhälften als lockeres Dispirem vor.

6) Rekonstruktionsphase (R):
Die beiden Tochterzellen sind bis auf einen dünnen Plasmafaden oder auch bereits vollständig voneinander getrennt und enthalten jeweils ein festes Spirem. Kernmembran und Nucleoli fehlen noch.

Aus den Zählergebnissen wurden Mitose- und G/E-Indices errech-

net, sowie Reifungs- und karyologische Kurven aufgestellt. Der Mitoseindex errechnet sich aus der Zahl der Mitosen pro 1000 teilungsfähige Zellen der Erythro- (rMI) bzw. Granulopoese (wMI) und wird in Promille angegeben. Er erlaubt eine Aussage über die Regenerationsfähigkeit einer Zellreihe.

Der G/E-Index gibt das Zahlenverhältnis von Granulopoese zu Erythropoese an.

Die Reifungskurven zeigen die prozentualen Häufigkeiten der einzelnen hämatopoetischen Zellen der Erythro- bzw. Granulopoese in Abhängigkeit von der Kulturzeit.

Die karyologischen Kurven zeigen graphisch die prozentuale Mitosephasenverteilung, getrennt nach Erythro- und Granulopoese.

S T A T I S T I K

Zur Prüfung der Unterschiede auf Signifikanz in der Zellverteilung und den Mitoseindices zwischen Kontrolle und Versuch wird das χ^2-Verfahren nach Helmert-Pearson (86) verwendet. χ^2 ist ein Maß für die Übereinstimmung der verglichenen Werte und wird nach folgender Formel berechnet:

$$\chi^2 = \Sigma \frac{(B_K - E_K)^2}{E_K} + \frac{(B_Z - E_Z^2)}{E_Z}$$

wobei: B_K = Beobachtungswert der Kontrollkultur

E_K = Erwartungswert der Kontrollkultur

B_Z = Beobachtungswert der Zusatzkultur

E_Z = Erwartungswert der Zusatzkultur

Für die Mitoseindices wird ein Freiheitsgrad von 1, für die Erythropoese mit fünf Reifungsstufen ein Frei-

heitsgrad von 4 und für die Granulopoese mit elf Reifungsstufen ein Freiheitsgrad von 10 berücksichtigt.

Der zu χ^2 gehörende p-Wert wird entsprechend dem jeweiligen Freiheitsgrad aus einer mathematischen Tabelle entnommen (86). Bei $p < 0{,}01$ sprechen wir in dieser Arbeit von einem signifikanten Ergebnis.

$p < 0{,}01$, wenn

bei Freiheitsgrad 1	$\chi^2 > 6{,}635$
bei Freiheitsgrad 4	$\chi^2 > 13{,}277$
bei Freiheitsgrad 10	$\chi^2 > 23{,}209$

III. MATERIAL

Spender des Thrombozythämieserums

Das Thrombozythämieserum stammt von der 73-jährigen Patientin A.G. bei der erstmals 1980 eine unklare Anämie auffiel. Seit Anfang 1981 bestand der Verdacht auf ein myeloproliferatives Syndrom (MPS). Anfang 1982 wurden folgende Diagnosen gestellt:

MPS mit Sidero-Achresie bei Thrombozythämie
normochrome Anämie
biventrikuläre Herzinsuffizienz

Die Serumentnahme erfolgte am 1. 4. 1982

Blutbild vom 16. 3. 1982		Blutbild vom 17. 4. 1982	
Hb	8,3 g%	Hb	6,9 g%
HK	24 %	HK	23 %
Ery	2,7 Mill./µl	Ery	2,6 Mill./µl
HbE	30,7 pg	HbE	31,3 pg
Leuko	7000/µl	Leuko	7700/µl
St	6 %	St	6 %
Seg	76 %	Seg	67 %
eSeg	7 %	eSeg	2 %
Ly	9 %	Ly	18 %
Mo	2 %	Mo	7 %
Thrombo	693000/µl	Thrombo	600000/µl

Medikamentöse Therapie vor Serumentnahme

Am 3. 4. 1981 und 15. 10. 1981 jeweils 3 mCi P^{32} i.V. Venoruton ^{R}, Stenocardin ^{R}, DCKK ^{R}, Novalgin ^{R}, Lanitop ^{R}, Aristochol ^{R}.

Knochenmarkbefund vom 16. 3. 1982

Stark vermehrte Megakaryoblasten und Megakaryzoyten. Viele

Atypien wie übersegmentierte Megakaryozyten und basophile Riesenformen. Ineffektive, sideroblastische Erythropoese. Granulopoese vermindert; nicht verschoben.

Zellspender für Versuch 1

69-jähriger Patient H.S.

Klinische Diagnose

M. Hodgkin Stad. III B
euthyreote Struma
Gastritis

Blutbild vom 7. 6. 1982

Hb	15,0 g%	Seg	44 %
HK	45,2 %	eSeg	3 %
Ery	4,63 Mill./µl	Ly	49 %
HbE	32,3 pg	Mo	4 %
Leuko	9100/µl		
Thrombo	218000/µl	T-Zellen	64 %
Retikulo-zyten	37 °/oo	B-Zellen	27 %

Medikamentöse Therapie bis zur Sternalpunktion am 7. 6. 1982

6 x 1 El Maaloxan ^{R} . Beginn der zytostatischen Therapie erst am 18. 6. 1982.

Befund der Sternalpunktion vom 7. 6. 1982

Insgesamt zellarmes Mark ohne Anhalt für eine Infiltration bei bekanntem M. Hodgkin.

Zellspender für Versuch 2

58-jähriger Patient M.v.K.

Klinische Diagnose

Polyglobulie bei restriktiver Ventilationsstörung
benigne Magenausgangstenose bei Ulkusleiden
Hyperurikämie und Hypertonus

Blutbild vom 16. 11. 1982

Hb	17,0 g%	St	1 %
HK	52,4 %	Seg	74 %
Ery	5,42 Mill./µl	eSeg	2 %
HbE	31,3 pg	bSeg	1 %
Leuko	9000/µl	Ly	15 %
Thrombo	213000/µl	Mo	7 %

Medikamentöse Therapie bis zur Sternalpunktion am 16. 11. 1982

Ab 4. 11. 1982: 4 x 1 Btl. Maaloxan ^{R}, 5 x 1 Tbl Tagamet ^{R}
Ab 11. 11. 1982: zusätzlich 2 x 50 mg Beloc ^{R}.

Befund der Sternalpunktion vom 16. 11. 1982

Kein Anhalt für eine Polyzythämie.
Auffallende Plasmazellvermehrung, am ehesten reaktiv.

Zellspender für Versuch 3

74-jähriger Patient K.Z.

Klinische Diagnose

unspezifische Lymphadenitis mit relativer Lymphozytose. DD niedrig malignes Lymphom.

Blutbild vom 8. 2. 1983		Diff.-Blutbild vom 21. 1. 83	
Hb	14,6 g%	Seg	33 %
Hk	44,1 %	eSeg	4 %
Ery	4,77 Mill./µl	Ly	52 %
Leuko	5100/µl	Mo	11 %
Thrombo	171000/µl		

Medikamentöse Therapie bis zur Sternalpunktion am 8. 2. 1983

Digitalis.

Befund der Sternalpunktion vom 8. 2. 1983

Mäßige Vermehrung von kleinen Retikulumzellen und Lymphozyten. Erhaltene normale Hämatopoese.
Niedrig malignes non-Hodgkin-Lymphom mit Knochenmarkbeteiligung.

Zellspender für Versuch 4

69-jähriger Patient G.B.

Klinische Diagnose

Unklare rezidivierende Fieberschübe bei diffuser Raumforderung in beiden Leberlappen.

Blutbild vom 13. 4. 1983

Hb	9,5 g%
Hk	30,4 %
Ery	3,5 Mill./µl
HbE	27 pg
Leuko	23300/µl
Thrombo	370000/µl

Diff.-Blutbild vom 12. 4. 1983

St	6 %
Seg	85 %
Ly	4 %
Mo	5 %
toxische Granulation	

Medikamentöse Therapie bis zur Sternalpunktion am 13. 4. 1983

bis zum 24.3.83: Ampicillin R, Bidocef R, Novalgin R, Spasmo-Cibalgin R.

vom 24.3. bis 30.3.83: 2 Tbl Lanitop R/die, 3 x 1 g Gramaxin R/die, Novalgin R bei Bedarf.

Ab 6.4.83 3 x 80 mg Gernebcin R.

Befund der Sternalpunktion vom 13. 4. 1983

Blut-Lymphozyten vermehrt. Granulopoese links verschoben. Erythropoese vermindert. Fe-Speicherung reichlich. Befund wie bei chronischer Abwehrreaktion.

Zellspender für Versuch 5

7O-jährige Patientin A.S.

Klinische Diagnose

dekompensiertes autonomes Adenom der Schilddrüse
ätiologisch unklare Leukopenie
zerebrovaskuläre Insuffizienz
Leberzyste im linken Leberlappen, Nierenzyste links.

Blutbild vom 3.5.1983		Diff.-Blutbild vom 10.5.1983	
Hb	14,5 g%	Seg	44 %
Hk	41,2 %	eSeg	4 %
Ery	4,78 Mill./µl	Ly	39 %
HbE	3O,3 pg	Mo	13 %
Leuko	2100/µl		
Thrombo	236000/µl		

Medikamentöse Therapie bis zur Sternalpunktion am 9.5.1983

Keine.

Befund der Sternalpunktion vom 9. 5. 1983

Geringgradige Rechtsverschiebung der Granulopoese.
Die Granulozytopenie ist jedoch aus dem Knochenmarkbefund nicht erklärbar. Eosinophilie und Plasmazellvermehrung sprechen für eine chronische Entzündung.

IV. ERGEBNISSE

Versuch 1 mit dem Knochenmark des Patienten H.S.

Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 2, S. 26;Tab. 1, S. 28)

Im Originalausstrich zeigt sich eine normale Verteilung der roten Vorstufen. In der Kontrollkultur nehmen die PE, bE und pE bis 48 Stunden in deutlich stärkerem Maße als bei T-Serumzusatz ab. Nach 72 Stunden ist die Zellverteilung zwischen Kontrolle und Versuch nahezu identisch. Die reifen und oxyphilen Erythroblasten nehmen einer fortschreitenden Ausreifung entsprechend am 1. und 2. Kulturtag bei Kontrolle stärker zu als bei T.-Serumzusatz.

Rote Mitose-Indices (Tab. 3, S. 30)

Nach 24 Std. steigt der rote Mitoseindex bei T.-Serumzusatz minimal im Vergleich zur Kontrolle an (17,7 °/oo gegenüber 16,5 °/oo). Nach 48 Std. ist er im Versuchsansatz mit 8 °/oo gegenüber 18 °/oo bei der Kontrolle erniedrigt, bei jeweils nur einer gefundenen Mitose. Am 3. Kulturtag besteht keine Mitoseaktivität mehr.

Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 3, S. 27; Tab. 2, S. 29)

Im Originalpräparat findet sich eine Normalverteilung bis leichte Rechtsverschiebung. Im Laufe des 1. Kulturtages steigen bei der Kontrolle die teilungsfähigen weißen Vorstufen zunächst an und fallen ab dem 2. Tag wieder ab. Die segmentkernigen Granulozyten nehmen während der gesamten Kulturdauer zu. Bei T.-Serumzusatz sind nach 48 und 72 Std. die Myelozyten und Promyelozyten deutlich gegenüber den Kontrollen vermehrt.

Weiße Mitoseindices (Tab. 4, S. 30)

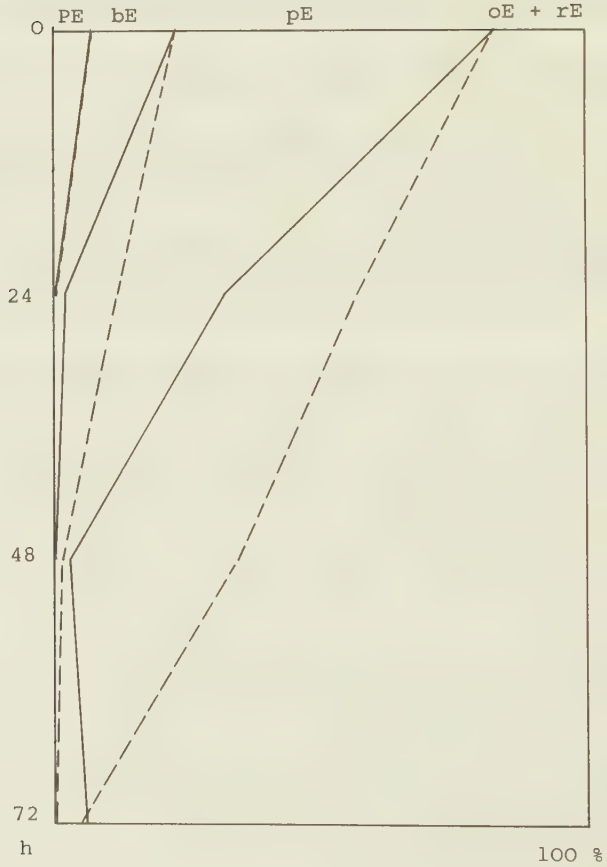
An sämtlichen Kulturtagen finden sich bei Serumzusatz höhere weiße Mitoseindices als bei den Kontrollen. Deutlich ist der Unterschied nach 72 Std. mit 27,6 °/oo gegenüber 8,1 °/oo.

Zellen der Megakaryopoese (Tab. 5, S. 30)

Megakaryoblasten, Promegakaryozyten und reife Megakaryozyten werden im weiteren wegen der kleinen Zahlen als Megakaryozyten (Mk) zusammengefaßt.
Bei Differenzierung von 2000 Knochenmarkzellen finden sich im Versuchsansatz nach 48 Std. 2(1°/oo) und nach 72 Std. 1(0,5°/oo) Megakaryozyt gegenüber keinem bei der Kontrolle.

Da bei dieser Vorgehensweise nur sehr wenige Mk in die Auswertung eingehen, wurden zusätzlich noch sämtliche Präparate in der Übersichtsvergrößerung durchgesehen. Die Gesamtzahl von Mk pro Präparat wurde ermittelt und die Ergebnisse der jeweils 3 Präparate von Kontrolle und Zusatz zum Prüfzeitpunkt miteinander verglichen. Eine statistische Vergleichbarkeit der hierbei erzielten Ergebnisse ist wegen der unterschiedlichen Gesamtzahl aller Knochenmarkzellen auf den einzelnen Präparaten nicht möglich. Da die absolute Zahl von Knochenmarkzellen pro Präparat jedoch zufällig verteilt sein dürfte, müßte sich bei Zusammenfassung aller Versuche zumindest ein Trend der Mk-Häufigkeit ablesen lassen. Diejenigen Präparate mit nur sehr geringer Gesamtzellzahl oder schlechter färberischer Qualität werden nicht berücksichtigt und in den entsprechenden Tabellen mit einem Querstrich (-) gekennzeichnet.
Sowohl am 2. (4 gegenüber 1), als auch am 3. Kulturtag (7 gegegenüber 3) sind die Mk der Zusatzpräparate vermehrt gegenüber den Kontrollen.

Abbildung 2:
Reifungskurve der Erythropoese, Versuch 1

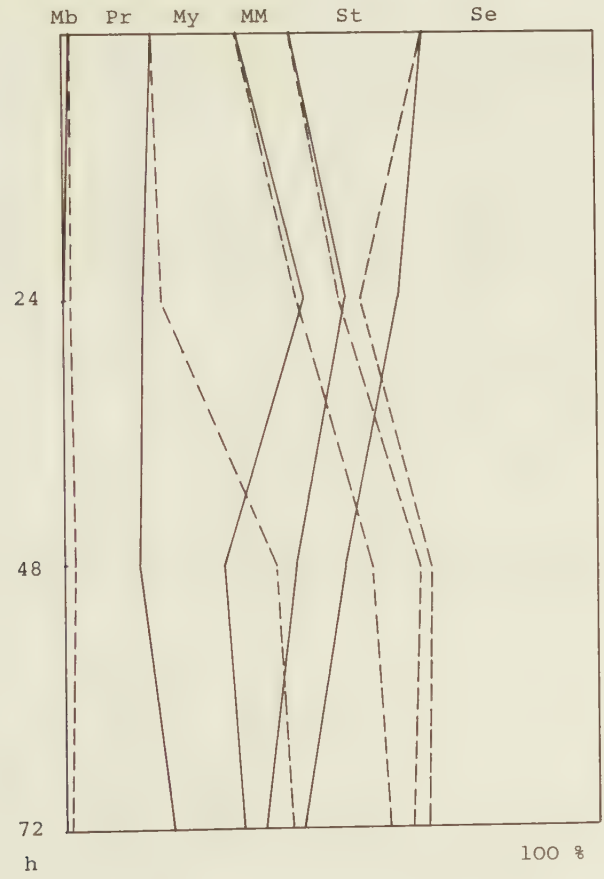


Kontrolle ————————

Zusatz --------

Um die Vergleichbarkeit mit früheren Arbeiten zu erleichtern, wurde die unabhängige Variable nach unten aufgetragen.

Abbildung 3:
Reifungskurve der Granulopoese, Versuch 1



Kontrolle ————
Zusatz --------

Tabelle 1: Signifikanzberechnung für die Reifungskurve der Erythropoese

Erythropoese: Versuch 1

	B		E		$(B-E)^2/E$	
Zelltyp	K	Z	K	Z	K	Z
			24 Stunden			
PE	2	3	3,02	1,98	0,34	0,52
bE	9	47	33,82	22,18	18,21	27,77
pE	168	174	206,53	135,46	7,19	10,96
oE	123	57	108,70	71,30	1,88	2,87
rE	285	104	234,92	154,08	10,67	16,28
	$\chi^2_4 = 96,69$; $p < 0,01$					
			48 Stunden			
PE	0	0	0	0	0	0
bE	0	4	1,95	2,05	1,95	1,85
pE	7	85	44,90	47,10	31,99	30,49
oE	49	36	41,49	43,51	1,36	1,30
rE	190	133	157,65	165,35	6,64	6,33
	$\chi^2_4 = 81,91$; $p < 0,01$					
			72 Stunden			
PE	0	0	0	0	0	0
bE	1	0	0,47	0,53	0,60	0,53
pE	7	6	6,11	6,89	0,13	0,11
oE	72	49	56,91	64,09	4,00	3,55
rE	31	70	47,50	53,50	5,73	5,09
	$\chi^2_4 = 19,74$; $p < 0,01$					

Der Unterschied beider Reihen ist zu allen Prüfzeiten statistisch gesichert.

Tabelle 2: Signifikanzberechnung für die Reifungskurve der Granulopoese. Granulopoese: Versuch 1

	$(B-E)^2/E$		$(B-E)^2/E$	
Zelltyp	K	Z	K	Z
	24 Stunden		48 Stunden	
Mb	3,97	3,72	6,97	7,24
Pr	0,63	0,59	74,02	76,93
My	2,09	1,90	0,21	0,22
eMy	4,05	3,79	1,03	1,07
Pmo	0,07	0,07	1,88	1,96
MM	0,06	0,06	6,91	7,18
St	13,11	11,59	28,87	30,01
Se	5,05	4,73	23,91	24,85
eSe	0,00	0,00	0,63	0,66
bSe	0,01	0,00	0,69	0,72
Mo	0,01	0,01	3,04	3,15
	$\chi^2_{10} = 55,51;\ p < 0,01$		$\chi^2_{10} = 302,15; p < 0,01$	
	72 Stunden			
Mb	5,43	5,51		
Pr	51,82	52,65		
My	6,97	7,08		
eMy	0,32	0,32		
Pmo	0,37	0,37		
MM	0,06	0,06		
St	13,31	13,52		
Se	53,07	53,92		
eSe	3,26	3,31		
bSe	0,47	0,48		
Mo	14,99	15,22		
	$\chi^2_{10} = 302,51;\ p < 0,01$			

Der Unterschied beider Reihen ist zu allen Prüfzeiten statistisch signifikant.

Tabelle 3: Mitoseindices der Erythropoese (°/oo).
Versuch 1

Stunden	0	24	48	72
Original	1,0			
Kontrolle		16,5	18,0	0
Zusatz		17,7	8,0	0

Tabelle 4: Mitoseindices der Granulopoese (°/oo).
Versuch 1

Stunden	0	24	48	72
Original	3,8			
Kontrolle		3,3	11,7	8,1
Zusatz		9,6	16,5	27,6

Tabelle 5: Zellen der Megakaryopoese (Mk)
Versuch 1

	K		Z	
	Mk(°/oo)	Mk(Übersicht)	Mk(°/oo)	Mk(Übersicht)
24 Std.	0	0; 0; 0	0	0; 0; 0
48 Std.	0	0; 0; 1	1	0; 2; 2
72 Std.	0	0; 1; 2	0,5	0; 2; 5

Bei der Angabe in °/oo werden die bei Differenzierung von 2000 Zellen gefundenen Megakaryozyten berücksichtigt. Bei der Übersichtsauswertung werden zu jedem Zeitpunkt die 3 vorhandenen Präparate durchgesehen und die absolute Zahl von Mk angegeben.

Versuch 2 mit dem Knochenmark des Patienten M.v.K.

Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 4, S. 33; Tab. 6, S. 35)

Die Originalpräparate zeigen eine Normalverteilung der Erythropoese. Ebenso wie im Versuch 1 kommt es bei der Kontrollkultur besonders innerhalb der ersten 24 Std. zu einem deutlichen Absinken der PE, bE und pE bei entsprechender Zunahme der Ausreifung.
Die frühen teilungsfähigen roten Vorstufen PE, bE und die pE sind bei T.-Serumzusatz während der gesamten Kulturdauer deutlich gegenüber denjenigen der Kontrolle vermehrt.

Rote Mitose-Indices (Tab. 8, S. 37)

Bei Zusatz des Thrombozythämieserums zeigen sich die roten Mitoseindices an allen Kulturtagen erhöht; verglichen mit denen der Kontrolle, nach 24 Std. 32 °/oo gegen 17,7 °/oo, nach 48 Std. 20,3 °/oo gegen 9,2 °/oo und nach 72 Stunden 21 °/oo gegenüber 0 °/oo.

Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 5, S. 34 ; Tab. 7, S. 36)

Die Granulopoese der Originalpräparate ist rechtsverschoben. Am 1. und 2. Kulturtag ist der Anteil von segmentkernigen Granulozyten bei der Kontrolle deutlich höher als nach T.-Serumzusatz.
Auf den Zusatzpräparaten des 1. Kulturtages fällt insbesondere ein Anstieg der Promyelozytenhäufigkeit auf. Die teilungsfähigen weißen Vorstufen sind an sämtlichen Kulturtagen bei T.-Serumzusatz gegenüber den Kontrollen vermehrt.

Weiße Mitoseindices (Tab. 9, S. 37)

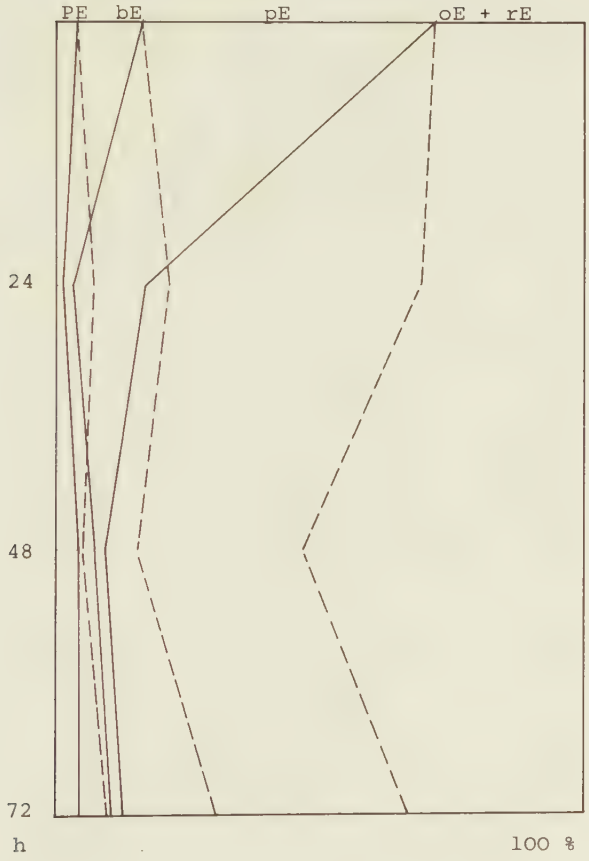
Nach 24 Std. (12,1 °/oo gegen 3,8 °/oo) und 72 Std. (21,7 °/oo gegen 9,8 °/oo) ist der weiße Mitoseindex des

Versuchsansatzes gegenüber der Kontrolle deutlich erhöht, nach 48 Std. minimal erniedrigt.

Zellen der Megakaryopoese (Tab. 10, S. 37)

Mit Ausnahme des 2. Versuchstages, an dem sich bei Auswertung von 2000 Zellen 4 Mk (2 °/oo) bei der Kontrolle gegenüber keinem bei Zusatz, bzw. bei Übersichtsauswertung der Kontrolle 9 Mk gegenüber 6 Mk bei Zusatz finden, sind die Ergebnisse der übrigen Kulturtage nahezu identisch.

Abbildung 4:
Reifungskurve der Erythropoese, Versuch 2



Kontrolle ————
Zusatz --------

Abbildung 5:
Reifungskurve der Granulopoese, Versuch 2

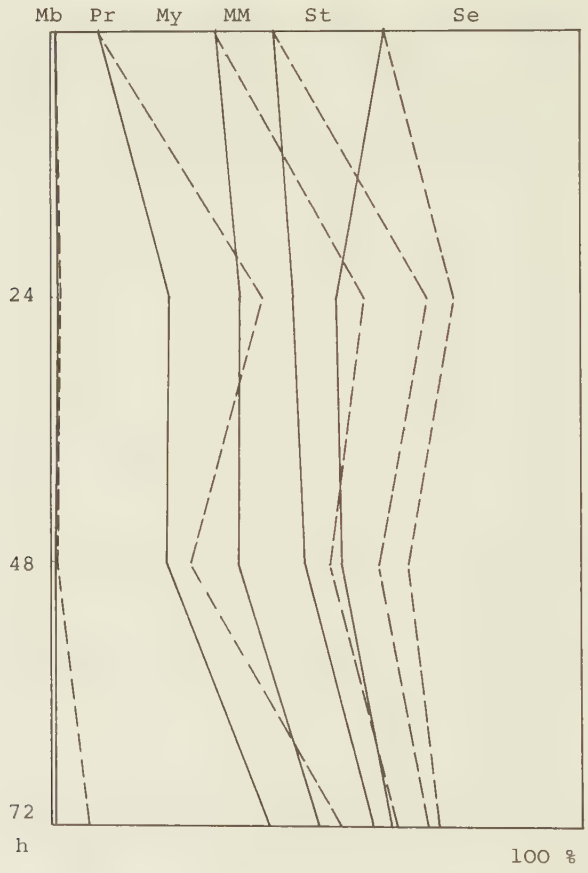


Tabelle 6: Signifikanzberechnung für die Reifungskurve der Erythropoese. Erythropoese: Versuch 2

	B		E		$(B-E)^2/E$	
Zelltyp	K	Z	K	Z	K	Z
			24 Stunden			
PE	5	60	26,58	38,42	17,52	12,12
bE	10	114	50,72	73,28	32,69	22,62
pE	69	387	186,51	269,49	74,04	51,24
oE	142	95	96,94	140,06	20,94	14,49
rE	327	143	192,24	277,76	94,47	63,38
			$\chi^2 = 403,51$; $p < 0,01$			
			48 Stunden			
PE	9	19	10,36	17,64	0,18	0,10
bE	7	42	18,14	30,86	6,84	4,02
pE	4	127	48,49	82,51	40,82	23,99
oE	88	9	35,90	61,10	75,61	44,43
rE	130	208	125,11	212,89	0,19	0,11
			$\chi^2 = 196,29$; $p < 0,01$			
			72 Stunden			
PE	14	51	23,35	41,65	3,74	2,10
bE	19	111	46,70	83,30	16,43	9,21
pE	7	192	71,49	127,51	58,17	32,62
oE	74	36	39,52	70,48	30,08	16,87
rE	191	154	123,94	221,06	36,28	20,34
			$\chi^2 = 225,84$; $p < 0,01$			

Der Unterschied beider Reihen ist zu allen Prüfzeiten statistisch gesichert.

Tabelle 7: Signifikanzberechnung für die Reifungskurve der Granulopoese: Granulopoese: Versuch 2

	$(B-E)^2/E$		$(B-E)^2/E$	
Zelltyp	K	Z	K	Z
	24 Stunden		48 Stunden	
Mb	0,26	0,34	0,67	0,73
Pr	27,11	35,97	4,20	4,57
My	10,10	13,40	34,72	37,77
eMy	0,17	0,22	0,41	0,45
Pmo	0,02	0,02	1,40	1,52
MM	1,44	1,91	2,91	3,17
St	2,15	2,86	0,16	0,17
Se	18,07	23,98	6,50	7,07
eSe	3,49	4,64	1,90	2,06
bSe	0,02	0,02	0,06	0,06
Mo	14,44	19,16	10,04	10,92
	$\chi^2_{10} = 179,79$; $p < 0,01$		$\chi^2_{10} = 131,46$; $p < 0,01$	

	72 Stunden	
Mb	33,18	36,47
Pr	3,77	4,14
My	3,21	3,53
eMy	2,15	2,36
Pmo	0,01	0,01
MM	7,45	8,19
St	1,83	2,01
Se	2,62	2,88
eSe	8,37	9,21
bSe	0,59	0,65
Mo	1,97	2,17
	$\chi^2_{10} = 136,77$; $p < 0,01$	

Der Unterschied beider Reihen ist zu allen Prüfzeiten statistisch gesichert.

Tabelle 8: Mitoseindices der Erythropoese (°/oo).
Versuch 2

Stunden	0	24	48	72
Original	20,2			
Kontrolle		17,7	9,2	0
Zusatz		32,0	20,3	21,0

Tabelle 9: Mitoseindices der Granulopoese (°/oo).
Versuch 2

Stunden	0	24	48	72
Original	1,7			
Kontrolle		3,8	14,4	9,8
Zusatz		12,1	14,2	21,7

Tabelle 10: Zellen der Megakaryopoese (Mk)
Versuch 2

	K		Z	
	Mk(°/oo)	Mk(Übersicht)	Mk(°/oo)	Mk(Übersicht)
24 Std.	0,5	0; 1; 2	0	0; 2; 2
48 Std.	2,0	-; 4; 5	0	0; 2; 4
72 Std.	1,0	3; 3; 3	1,5	-; 2; 3

- bedeutet: nicht auswertbares Präparat

Versuch 3 mit dem Knochenmark des Patienten K.Z.

Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 6, S. 40; Tab. 11, S. 42)

In der Reifungskurve der Erythropoese kommt es bei Normalverteilung im Originalausstrich nach 24 Std. bei der Kontrolle zu einer deutlichen Zunahme der oE und rE auf Kosten vor allem der pE. Nach 72 Std. sind nur noch rE und oE bei insgesamt nur noch 38 Zellen der roten Reihe vorhanden.

Im Versuchsansatz nehmen die PE, bE und pE zusammen nach 24 Std. geringfügig ab; nach 72 Std. finden sich keine Zellen der roten Reihe mehr.

Rote Mitose-Indices (Tab. 13, S.44)

Bei den roten Mitoseindices kommt es bei einem Ausgangswert im Originalpräparat von 3,9 °/oo, nach 24 Std. im Versuchspräparat zu einem deutlichen Anstieg auf 24,4 °/oo und zu einem Rückgang auf Null nach 72 Std. Auf den Kontrollpräparaten finden sich keine Mitosen der roten Reihe.

Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 7, S. 41; Tab. 12, S.43)

Die Originalpräparate zeigen eine Normalverteilung bis leichte Rechtsverschiebung. In der Reifungskurve der Granulopoese nehmen die nicht mehr teilungsfähigen Zellen bei der Kontrolle im Verlaufe der viertägigen Beobachtungszeit deutlicher zu als bei T.-Serumzusatz. Beim Versuchsansatz kommt es nach 24 Std. zu einem vermehrten Anstieg der Granuloblasten, die dann an sämtlichen Kulturtagen gegenüber den Kontrollen erhöht bleiben.

Weiße Mitoseindices (Tab. 14, S. 44)

Nach 24 Std. sind die weißen Mitoseindices sowohl bei der Kontrolle als auch beim Versuchsansatz von 2 °/oo im Originalpräparat auf 0 °/oo zurückgegangen. Nach 72 Std. und 96 Std. finden sich bei T.-Serumzusatz deutlich höhere Mitoseraten als bei Kontrolle mit Werten von 15,6 °/oo gegen 2,3 °/oo und 18,4 °/oo gegen 0 °/oo.

Zellen der Megakaryopoese (Tab. 15, S. 44)

Bei Auswertung von 2000 Zellen finden sich bis auf 2 Mk (1 °/oo) bei den Versuchspräparaten des 3. Kulturtages keine weiteren Megakaryozyten. Bei der Übersichtsauswertung aller Präparate sind lediglich jeweils 2 Mk auf den Zusatzpräparaten des 3. und 4. Kulturtages sowie insgesamt 1 Mk auf den Originalpräparaten nachweisbar.

Abbildung 6:
Reifungskurve der Erythropoese, Versuch 3

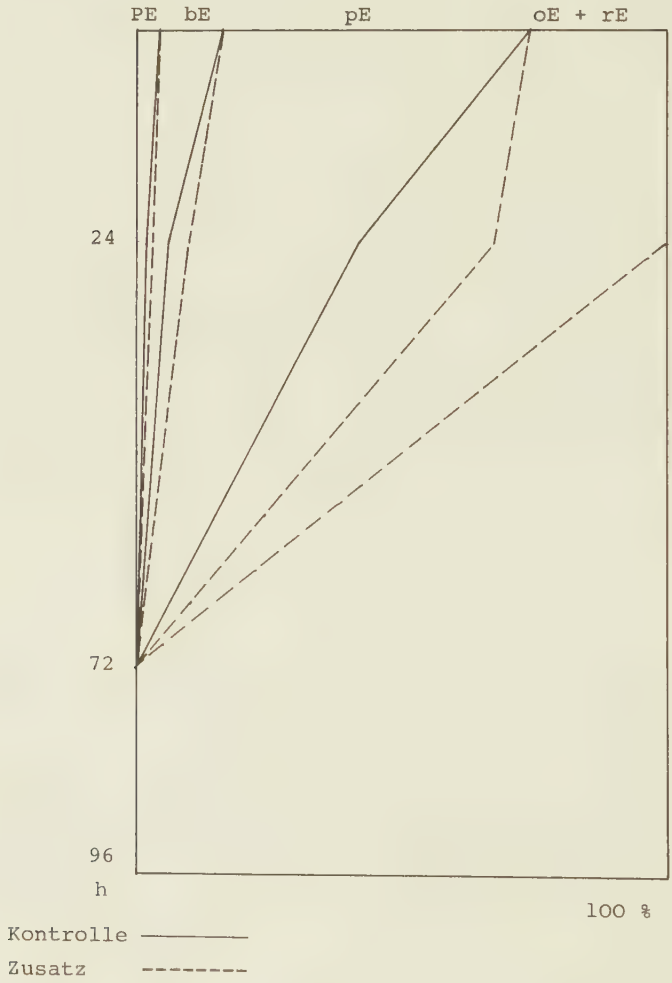


Abbildung 7:
Reifungskurve der Granulopoese, Versuch 3

Kontrolle ————
Zusatz --------

Tabelle 11: Signifikanzberechnung für die Reifungskurve der Erythropoese

Erythropoese: Versuch 3

	B		E		$(B-E)^2/E$	
Zelltyp	K	Z	K	Z	K	Z
			24 Stunden			
PE	4	7	5,89	5,11	0,61	0,70
bE	12	17	15,53	13,47	0,80	0,92
pE	94	132	121,02	104,98	6,03	6,95
oE	82	49	70,15	60,85	2,00	2,31
rE	72	24	51,41	44,59	8,25	9,51
			$\chi^2_4 = 38,08;\ p < 0,01$			
			72 Stunden			
PE	0	0				
bE	0	0				
pE	0	0				
oE	11	0				
rE	27	0				
			$\chi^2_4 = 0;\ p > 0,01$			
			96 Stunden			
PE	0	0				
bE	0	0				
pE	0	0				
oE	3	0				
rE	4	0				
			$\chi^2_4 = 0;\ p > 0,01$			

Tabelle 12: Signifikanzberechnung für die Reifungskurve der Granulopoese. Granulopoese: Versuch 3

	$(B-E)^2/E$		$(B-E)^2/E$	
Zelltyp	K	Z	K	Z
	24 Stunden		72 Stunden	
Mb	2,23	2,16	8,72	7,95
Pr	2,82	2,73	33,69	30,72
My	12,26	11,88	0,10	0,09
eMy	0,18	0,17	0,02	0,02
Pmo	0,61	0,59	1,91	1,75
MM	0,89	0,86	6,09	5,55
St	42,46	41,14	31,49	28,72
Se	7,04	6,82	1,29	1,18
eSe	4,85	4,70	0,68	0,62
bSe	0,82	0,90	0,12	0,11
Mo	4,28	4,15	24,11	21,98
	$\chi^2_{10} = 154,54$; $p < 0,01$		$\chi^2_{10} = 206,91$; $p < 0,01$	

	96 Stunden	
Mb	7,22	5,96
Pr	92,54	76,33
My	3,36	2,77
eMy	3,16	2,60
Pmo	0,00	0,00
MM	1,22	1,00
St	2,56	2,11
Se	17,94	14,80
eSe	1,23	1,01
bSe	1,98	1,64
Mo	10,15	8,37

$\chi^2_{10} = 257,95$; $p < 0,01$

Der Unterschied beider Reihen ist zu allen Prüfzeiten statistisch gesichert.

Tabelle 13: Mitoseindices der Erythropoese (‰).
Versuch 3

Stunden	0	24	72	96
Original	3,9			
Kontrolle		0	0	0
Zusatz		24,4	0	0

Tabelle 14: Mitoseindices der Granulopoese (‰).
Versuch 3

Stunden	0	24	72	96
Original	2,0			
Kontrolle		0	2,3	0
Zusatz		0	15,6	18,4

Tabelle 15: Zellen der Megakaryopoese (Mk)
Versuch 3

	K		Z	
	Mk(‰)	Mk(Übersicht)	Mk(‰)	Mk(Übersicht)
24 Std.	0	0; 0; 0	0	0; 0; 0
72 Std.	0	0; 0; 0	1,0	0; 0; 2
96 Std.	0	0; 0; 0	0	0; 0; 2

Versuch 4 mit dem Knochenmark des Patienten G.B.

Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 8, S.47 ; Tab. 16, S.49)

Die Erythropoese der Originalpräparate zeigt eine Normalverteilung.
Beim Versuchsansatz ist die Abnahme der bE und pE nach 24 Std. deutlich geringer ausgeprägt als bei der Kontrolle. Bei weiterer Ausreifung sind nach 3-tägiger Kulturdauer bei der Kontrolle nur noch rE und oE vorhanden. Bei T.-Serumzusatz ist die Zellverteilung der roten Reihe nach 24 Std. und 72 Std. nahezu gleich.

Rote Mitose-Indices (Tab. 18, S. 51)

Der rote Mitoseindex im Original beträgt 10,8 °/oo. An den verschiedenen Kulturtagen finden sich weder bei Kontrolle noch bei Versuch Zellteilungsfiguren der roten Reihe.

Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 9, S. 48; Tab. 17, S. 50)

Die Granulopoese der Originalpräparate ist normal verteilt. In der Reifungskurve der Granulopoese des Versuchsansatzes kommt es nach 24 Std. zu einem deutlicheren Anstieg der teilungsfähigen Zellen - insbesondere der Promyelozyten - gegenüber der Kontrolle. Diese relative Vermehrung der Granuloblasten bei T.-Serumzusatz hält bis zum 3. Kulturtag an. Danach sind die teilungsfähigen Vorstufen im Gegensatz zu den übrigen Versuchen, bei Thrombozythämieserumzusatz niedriger als bei der Kontrolle. Sowohl bei Kontrolle als auch bei Zusatz läßt sich im Verlaufe der Kulturdauer eine kontinuierliche Ausreifung der weißen Reihe an der Zunahme der nicht teilungsfähigen Zellen ablesen.

Weiße Mitoseindices (Tab. 19, S. 51)

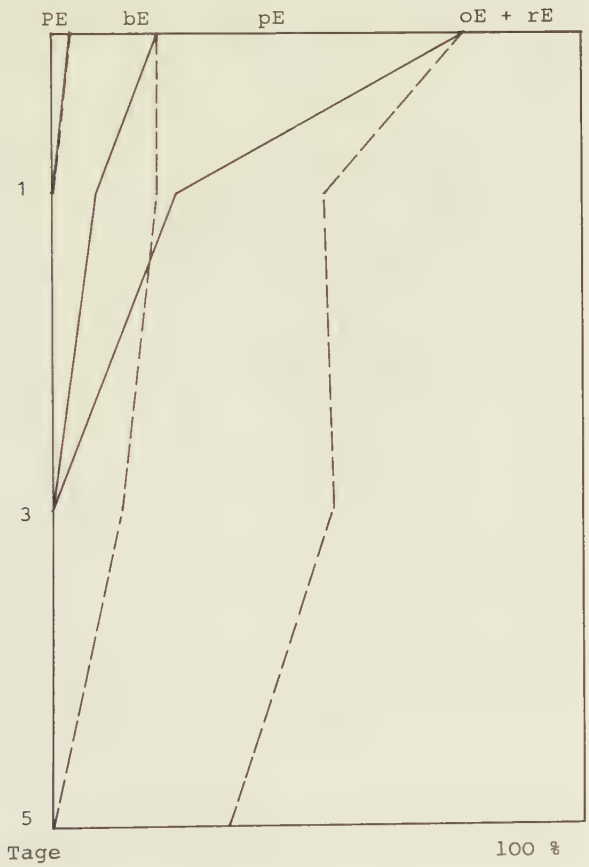
Beim Versuchsansatz kommt es nach 24 Std. zu einem deutlichen Anstieg der weißen Mitosen mit Werten von 8,1 °/oo gegen 0 °/oo. Am 3. und 5. Kulturtag finden sich bei den Kontrollen im Gegensatz zu den übrigen Versuchen höhere Mitoseindices als bei T.-Serumzusatz.

Zellen der Megakaryopoese (Tab. 20, S. 51)

Bei Differenzierung von 2000 Zellen finden sich bei den Zusatzpräparaten des 3. und 5. Kulturtages 4 (2 °/oo) bzw. 6 (3 °/oo) Mk gegenüber Null bei den Kontrollen.

Bei der Übersichtsauswertung ist die Vermehrung der Mk der Zusatzpräparate gegenüber den Kontrollen ebenfalls am 3. und 5. Kulturtag am ausgeprägtesten mit Werten von durchschnittlich 15 gegen 11 und 22 gegen 6 Mk pro Präparat. Am 1. Tag lautet das Verhältnis 3 gegen 1, am 8. Tag 1 gegen 0.

Abbildung 8:
Reifungskurve der Erythropoese, Versuch 4



Kontrolle ————
Zusatz --------

Abbildung 9:
Reifungskurve der Granulopoese, Versuch 4

Kontrolle ————————
Zusatz --------

Tabelle 16: Signifikanzberechnung für die Reifungskurve der Erythropoese. Erythropoese: Versuch 4

	B		E		$(B-E)^2/E$	
Zelltyp	K	Z	K	Z	K	Z
			1. Tag			
PE	0	0	0	0	0	0
bE	10	34	18,08	25,92	3,61	2,52
pE	18	54	29,59	42,41	4,54	3,17
oE	64	50	46,85	67,15	6,28	4,38
rE	28	34	25,48	36,52	0,25	0,17
			$\chi^2_4 = 24,92$; $p < 0,01$			
			3. Tag			
PE	0	0	0	0	0	0
bE	0	15	2,96	12,04	2,96	0,73
pE	0	45	8,87	36,13	8,87	2,18
oE	8	18	5,13	20,87	1,61	0,39
rE	20	36	11,04	44,96	7,27	1,79
			$\chi^2_4 = 25,80$; $p < 0,01$			
			5. Tag			
PE	0	0				
bE	0	0				
pE	0	12				
oE	0	6				
rE	0	18				

Am 8. und 10. Kulturtag finden sich keine Zellen der Erythropoese mehr.

Tabelle 17: Signifikanzberechnung für die Reifungskurve der Granulopoese. Granulopoese: Versuch 4

	$(B-E)^2/E$		$(B-E)^2/E$	
Zelltyp	K	Z	K	Z
	1. Tag		3. Tag	
Mb	4,10	4,31	2,04	2,12
Pr	41,27	43,36	10,71	11,19
My	0,36	0,38	0,93	0,97
eMy	0,23	0,25	3,29	3,43
Pmo	0,94	0,98	1,41	1,47
MM	10,52	11,05	5,96	6,23
St	29,55	31,04	14,76	15,42
Se	1,07	1,12	21,00	21,95
eSe	1,39	1,46	11,84	12,38
bSe	1,02	1,06	0,00	0,00
Mo	16,18	17,00	0,04	0,04
	$\chi^2_{10} = 218,64$; $p < 0,01$		$\chi^2_{10} = 147,18$; $p < 0,01$	
	5. Tag		8. Tag	
Mb	1,02	1,06	0,00	0,00
Pr	60,98	62,96	0,21	0,21
My	111,63	115,25	15,15	15,31
eMy	0,23	0,24	3,49	3,53
Pmo	0,00	0,00	0,00	0,00
MM	2,05	2,12	15,56	15,74
St	5,89	6,08	0,95	0,96
Se	2,31	2,39	3,07	3,10
eSe	0,58	0,60	3,37	3,41
bSe	0,00	0,00	0,00	0,00
Mo	0,37	0,39	19,51	19,72
	$\chi^2_{10} = 376,15$; $p < 0,01$		$\chi^2_{10} = 123,29$; $p < 0,01$	

Die Zusatzpräparate des 10. Versuchstages sind wegen schlechter Qualität nicht auswertbar.

Tabelle 18: Mitoseindices der Erythropoese (°/oo).
Versuch 4

Mit Ausnahme des Originalpräparates mit einem roten Mitoseindex von 10,8 °/oo findet sich weder bei den Kontroll- noch bei den Zusatzpräparaten eine Mitoseaktivität der roten Reihe.

Tabelle 19: Mitoseindices der Granulopoese (°/oo).
Versuch 4

Tage	0	1	3	5
Original	0			
Kontrolle		0	12,3	2,9
Zusatz		8,1	2,6	0

Am 8. und 10.Kulturtag finden sich keine Mitosen mehr.

Tabelle 20: Zellen der Megakaryopoese (Mk)
Versuch 4

	K		Z	
	Mk(°/oo)	Mk(Übersicht)	Mk(°/oo)	Mk(Übersicht)
1.Tag	1,0	0; 1; 2	1,0	-; 2; 4
3.Tag	0	-; 5; 17	2,0	10; 13; 21
5.Tag	0	-; 3; 10	3,0	13; 21; 32
8.Tag	0	-; -; 0	0	0; 1; 3
10.Tag	0	0; 0; 0	-	-; -; -

Nicht auswertbare Präparate werden mit einem Querstrich (-) gekennzeichnet.

Versuch 5 mit dem Knochenmark des Patienten A.S.

Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 10, S. 54;Tab. 21, S. 56)

Die Erythropoese der Originalpräparate zeigt eine Normalverteilung. Wie bei den übrigen Versuchen zeigt sich während der gesamten Kulturdauer ein vermehrter Anteil von PE, bE und pE beim Versuchsansatz gegenüber der Kontrolle. Am 4. Tag findet man bei den Kontrollen nur noch rE. Auch bei T.-Serumzusatz nehmen die reifen und oxyphilen Erythroblasten als Zeichen der Ausreifung zu.

Rote Mitoseindices (Tab. 23, S. 58)

Nach 24 Std. ist der rote Mitoseindex bei T.-Serumzusatz mit 27,1 °/oo gegen 0 °/oo deutlich höher als bei der Kontrolle. Am 4. und den folgenden Kulturtagen finden sich keine Mitosen der roten Reihe mehr.

Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 11, S. 55; Tab. 22, S. 57)

Im Originalpräparat findet sich eine Normalverteilung bis leichte Rechtsverschiebung. In der Reifungskurve der Granulopoese kommt es nach 24 Std. bei T.-Serumzusatz zu einer geringeren Abnahme der Granuloblasten - vor allem wegen der deutlichen Promyelozytenvermehrung - als bei der Kontrolle. Dieser Unterschied in der relativen Häufigkeit der weißen teilungsfähigen Vorstufen bleibt an sämtlichen Kulturtagen ablesbar. Die Summe von segmentkernigen und stabkernigen Granulozyten nimmt bei Kontrolle und Zusatz bis zum Ende der Beobachtungszeit zu.

Weiße Mitoseindices (Tab. 24, S. 58)

Bei T.-Serumzusatz sind die weißen Mitoseindices an allen Kulturtagen höher als bei den Kontrollen. Ausgeprägt ist der Unterschied am 4. Tag mit 28,1 °/oo gegen 0 °/oo, ebenfalls deutlich am 7. Tag mit 18,6 °/oo gegen 3,5 °/oo.

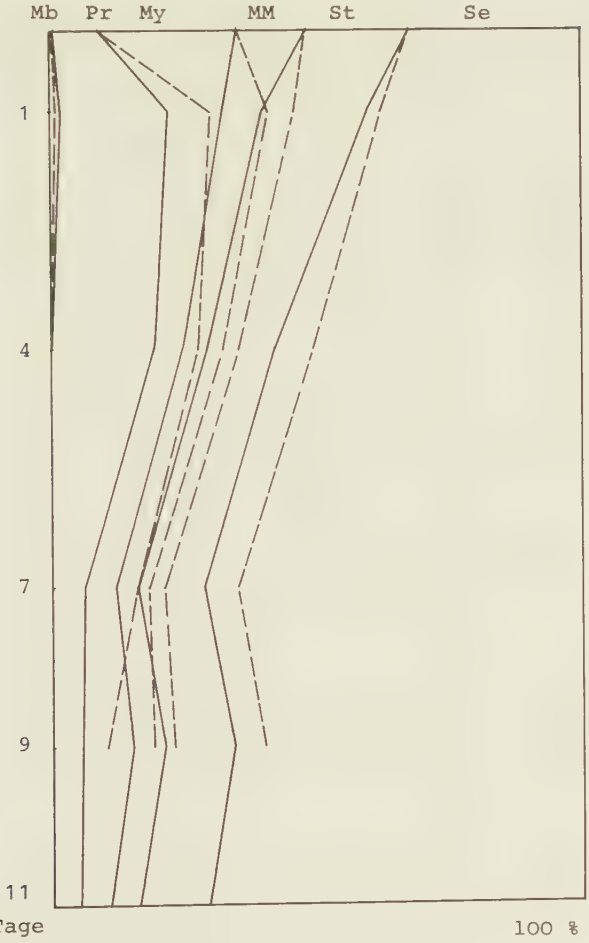
Zellen der Megakaryopoese (Tab. 25, S.58)

Bei Differenzierung von 2000 Zellen ist der vermehrte Anteil von Mk bei den Zusatzpräparaten gegenüber den Kontrollen am 4. Tag mit 6 Mk (3 °/oo) gegen 1 Mk (0,5 °/oo) und am 7. Tag mit 13 Mk (6,5 °/oo) gegen 0 Mk am ausgeprägtesten. Dies gilt auch für die Übersichtsauswertung, wobei sich bei T.-Serumzusatz durchschnittlich 9 Mk gegen 4 Mk bzw. 23 Mk gegen 0 Mk bei den Kontrollen pro Präparat finden.

Abbildung 10:
Reifungskurve der Erythropoese, Versuch 5

Kontrolle ————————
Zusatz ---------

Abbildung 11:
Reifungskurve der Granulopoese, Versuch 5



Kontrolle ————————
Zusatz --------

Tabelle 21: Signifikanzberechnung für die Reifungskurve der Erythropoese. Erythropoese:Versuch 5

	B		E		$(B-E)^2/E$	
Zelltyp	K	Z	K	Z	K	Z
			1. Tag			
PE	6	53	19,56	39,44	9,40	4,66
bE	10	65	24,86	50,14	8,88	4,40
pE	99	508	201,21	405,79	51,92	25,74
oE	119	36	51,38	103,62	88,99	44,13
rE	124	60	60,99	123,01	65,10	32,90
			$\chi^2_4 = 336,12;\ p < 0,01$			
			4. Tag			
PE	0	4	0,48	3,52	0,48	0,06
bE	0	8	0,96	7,04	0,96	0,13
pE	0	133	15,92	117,08	15,92	2,16
oE	0	43	5,15	37,85	5,15	0,70
rE	31	38	8,25	60,74	62,73	8,51
			$\chi^2_4 = 96,80;\ p < 0,01$			

	B		B	
	K	Z	K	Z
	7. Tag		9. Tag	
PE	0	0	0	0
bE	0	0	0	0
pE	0	28	0	24
oE	0	0	0	10
rE	0	24	0	56

Das Zusatzpräparat des 11. Tages ist wegen schlechter Qualität nicht auswertbar.

Tabelle 22: Signifikanzberechnung für die Reifungskurve der Granulopoese. Granulopoese: Versuch 5

	$(B-E)^2/E$		$(B-E)^2/E$	
Zelltyp	K	Z	K	Z
	1. Tag		4. Tag	
Mb	1,85	2,37	0,91	0,97
Pr	8,04	10,33	10,98	11,75
My	0,39	0,50	0,14	0,15
eMy	0,82	1,05	5,43	5,81
Pmo	0,29	0,37	0,00	0,00
MM	4,41	5,67	0,68	0,73
St	1,56	2,00	0,56	0,59
Se	0,12	0,15	4,35	4,66
eSe	0,00	0,00	0,85	0,91
bSe	0,00	0,00	0,00	0,00
Mo	0,02	0,02	0,11	0,12
	$\chi^2_{10} = 39,96$; $p < 0,01$		$\chi^2_{10} = 49,70$; $p < 0,01$	
	7. Tag		9. Tag	
Mb	0,00	0,00	0,00	0,00
Pr	26,13	26,34	8,12	8,67
My	18,69	18,84	0,82	0,88
eMy	0,34	0,34	3,48	3,71
Pmo	0,00	0,00	0,00	0,00
MM	2,75	2,77	24,94	10,21
St	0,06	0,06	3,37	3,60
Se	14,21	14,33	1,26	1,34
eSe	3,04	3,06	8,96	9,57
bSe	1,51	1,53	0,00	0,00
Mo	53,86	54,31	2,02	2,16
	$\chi^2_{10} = 242,17$; $p < 0,01$		$\chi^2_{10} = 93,11$; $p < 0,01$	

Der Unterschied beider Reihen ist zu allen Prüfzeiten statistisch gesichert.

Das Zusatzpräparat des 11. Kulturtages ist nicht auswertbar.

Tabelle 23: Mitoseindices der Erythropoese (‰).
Versuch 5

Tage	0	1	4	7
Original	3,6			
Kontrolle		0	0	0
Zusatz		27,1	0	0

Am 9. und 11.Kulturtag finden sich keine Mitosen mehr.

Tabelle 24: Mitoseindices der Granulopoese (‰).
Versuch 5

Tage	0	1	4	7
Original	0			
Kontrolle		3,8	0	3,5
Zusatz		8,8	28,1	18,6

Am 9. und 11.Kulturtag besteht bei der weißen Reihe keine Mitoseaktivität mehr.

Tabelle 25: Zellen der Megakaryopoese (Mk)
Versuch 5

	K		Z	
	Mk(‰)	Mk(Übersicht)	Mk(‰)	Mk(Übersicht)
1.Tag	0	0; 3; 4	0,5	2; 3; 3
4.Tag	0,5	-; 2; 7	3,0	6; 10; 11
7.Tag	0	0; 0; 0	6,5	-; 20; 27
9.Tag	0	0; 0; 0	1,0	-; 1; 1
11.Tag	0,5	-; 1; 1	-	-; -; -

V. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Mittlere Reifungskurve der Erythropoese (Abb.12,S. 63)

Bei T-Serumzusatz zeigt sich an sämtlichen Kulturtagen ein höherer Anteil von teilungsfähigen Erythroblasten als bei den Kontrollen. Innerhalb der verschiedenen Zellklassen ist dieser Unterschied am deutlichsten bei den polychromatischen Erythroblasten. Nach dem 4. Tag finden sich bei den Kontrollen im Unterschied zum T-Serumzusatz keine Zellen der roten Reihe mehr.

Mittlere rote Mitose-Indices (Abb.14, S. 64;Tab.26,S. 69)

Bei T-Serumzusatz sind die mittleren roten Mitoseindices an sämtlichen Kulturtagen gegenüber den Kontrollen erhöht. Der Unterschied ist am 1. + 2. Kulturtag signifikant mit 23,9 °/oo gegen 9,1 °/oo. Am 3. + 4. Tag lautet das Verhältnis 11,4 °/oo gegen 0 °/oo. Nach dem 4. Kulturtag treten keine Mitosefiguren der roten Reihe mehr auf.

Mittlere Reifungskurve der Granulopoese (Abb.15,S. 65)

Sowohl am 1. + 2. als auch am 3. + 4. Kulturtag findet sich bei T-Serumzusatz gegenüber der Kontrolle ein deutlich höherer Anteil von teilungsfähigen weißen Vorstufen, vor allem der Promyelozyten. Im Laufe der folgenden Kulturtage kommt es bei Versuch und Kontrolle zu einer weiteren Ausreifung und zu einem Angleichen des Verhältnisses von Granuloblasten zu nicht mehr teilungsfähigen weißen Vorstufen.

Mittlere weiße Mitose-Indices (Abb.13, S. 64;Tab.27,S. 70)

Die mittleren weißen Mitoseindices sind bei T-Serumzusatz an allen Kulturtagen höher als bei den Kontrollen, mit 10,2 °/oo gegen 5,2 °/oo am 1. + 2. Tag, mit 18,9 °/oo

gegen 6,9 °/oo am 3. + 4. Tag und 7,3 °/oo gegen 3,1 °/oo am 5. + 7. Tag. Die Unterschiede sind bei den am 1. + 2. und 3. + 4. zusammengefaßten Tagen signifikant.

Zusammenfassung der Zellen der Megakaryopoese
(Abb. 16, S. 66; Abb. 17, S. 66; Abb. 21, S. 68; Tab. 28, S. 71; Tab. 29, S. 72)

Bei dem durch Differenzierung von 2000 Zellen ermittelten prozentualen Anteil von Zellen der Megakaryopoese an der Gesamtzellzahl findet sich ab dem 3. Versuchstag eine Erhöhung der Mk bei T.-Serumzusatz gegenüber den Kontrollen mit 1,33 °/oo gegen 0,25 °/oo am 3. + 4. Tag, sowie 4,75 °/oo und 0,5 °/oo gegen jeweils 0 °/oo am 5. + 7. bzw. 8. + 9. Tag.

Bei Übersichtsauswertung und Ermittlung der durchschnittlichen Zahl von Mk pro Präparat finden sich ebenfalls ab dem 3. Kulturtag bei T.-Serumzusatz deutlich höhere Werte als bei den Kontrollen; am 3. + 4. Tag durchschnittlich 5,1 gegen 2,7 und am 5. + 7. Tag 22,6 gegen 2,6 Megakaryozyten pro auswertbares Präparat.
Zur Darstellung der Verteilung der drei Reifestadien der Megakaryopoese wird ebenfalls die Übersichtsauswertung herangezogen und zu den angegebenen Stichzeitpunkten die durchschnittliche Zahl der Reifungsformen pro auswertbares Präparat ermittelt.
Auf den 15 ausgewerteten Originalpräparaten finden sich durchschnittlich 0,1 Megakaryoblasten, 0,5 Promegakaryozyten und 0,1 Megakaryozyten pro Präparat. Vom 3. bis 7. Kulturtag sind nach T.-Serumzusatz die Megakaryoblasten und Promegakaryozyten zusammengerechnet - sowohl in absoluten Zahlen als auch prozentual - vermehrt gegenüber der Kontrolle mit durchschnittlich 5,0 (98 %) gegen 2,4 (89 %) am 3. + 4. Tag und 19,6 (87 %) gegen 1,8 (69 %) am 5. + 7. Tag pro auswertbares Präparat. Am 8. + 9. Tag sind auf den Kontrollpräparaten keine Zellen der Megakaryopoese nachweisbar, auf den Zusatzpräparaten hingegen durchschnittlich 1,2 Megakaryozyten.

Der Unterschied in der prozentualen Verteilung der drei Reifungsstadien zwischen Versuch und Kontrolle ist am 1. + 2. Tag minimal, am 3. + 4. Tag durch die Megakaryoblasten (29 % gegen 15 %), am 5. + 7. Tag durch die Promegakaryozyten (77 % gegen 38 %) und am 8. + 9. Tag durch die Megakaryozyten (100 % gegen 0 %) bedingt.
Die insgesamt relativ geringe Zahl von Zellen der Megakaryopoese auf den Kulturpräparaten ist zum einen sicher durch die Aufbereitung (siehe S. 11) bedingt, hat zum anderen aber auch färberische Ursachen. Auf manchen Präparaten finden sich sehr dicht und teilweise übereinanderliegende Zellen, sowie große Farbkleckse, die eine Differenzierung der Zellen unmöglich machen.

Karyologische Kurven (Abb. 18 und 19, S. 67)

In der Erythropoese wurden - ohne Berücksichtigung der Originalpräparate - insgesamt 73 Mitosen gefunden, wobei 11 auf die Kontrollkulturen und 62 auf die Versuchsansätze entfielen. Beim Versuchsansatz sind gegenüber den Kontrollen die Prophasen mit 25,8 °/oo gegen 63,6 °/oo deutlich erniedrigt; die übrigen Mitosephasen jedoch mit Ausnahme der Anaphasen vermehrt. Wegen der insgesamt sehr niedrigen Zahl von Mitosen in der Kontrollkultur ist jedoch der Unterschied in der Prophasenhäufigkeit nur von eingeschränkter Aussagekraft.

Bei der weißen Reihe wurden - ohne Originalpräparate - nach T.-Serumzusatz insgesamt 148 gegenüber 49 Mitosen bei den Kontrollen beobachtet. Der Häufigkeitsgipfel der Mitosephasen der Kontrollkulturen liegt bei den späten Metaphasen. Diese sind nach Zusatz des Versuchsserums prozentual deutlich erniedrigt; die frühen Metaphasen und Telophasen im Gegensatz dazu vermehrt.

Mittlere G/E-Indices (Abb. 20, S.68)

Der mittlere G/E-Index der Originalpräparate beträgt 3,1 und liegt damit innerhalb der Norm. Am ersten Versuchstag kommt es bei T.-Serumzusatz im Gegensatz zu den Kontrollen zu einer geringen Abnahme des G/E-Index auf 2,7. An den folgenden Kulturtagen nimmt das Zahlenverhältnis von granulopoetischen zu erythropoetischen Zellen sowohl bei Zusatz als auch bei Kontrollen kontinuierlich zu; bei Zusatz des Versuchsserums jedoch in deutlich geringerem Ausmaß.

Abbildung 12:
Mittelwertreifungskurve der Erythropoese

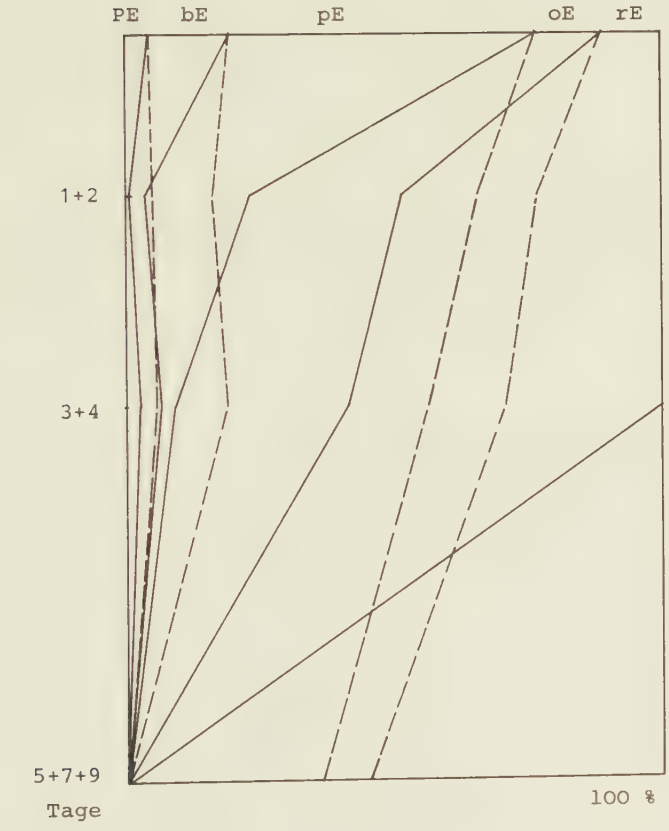


Abbildung 13:

Mittlere weiße Mitoseindices

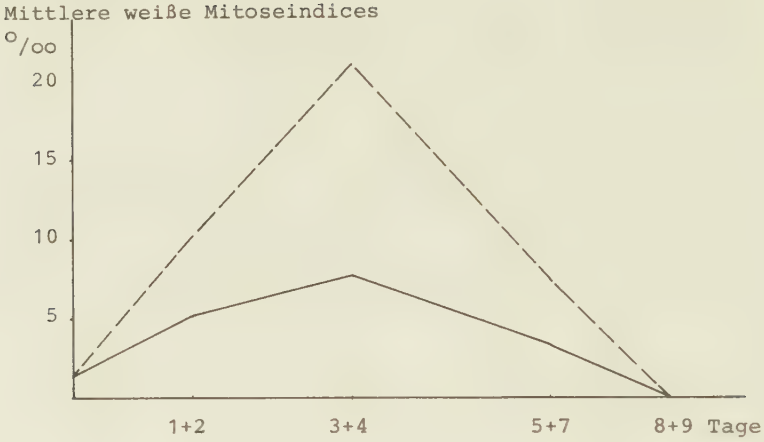


Abbildung 14:

Mittlere rote Mitoseindices

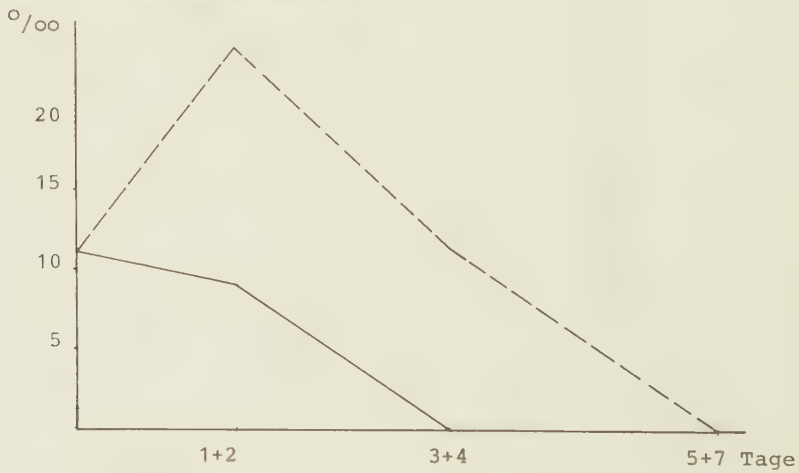
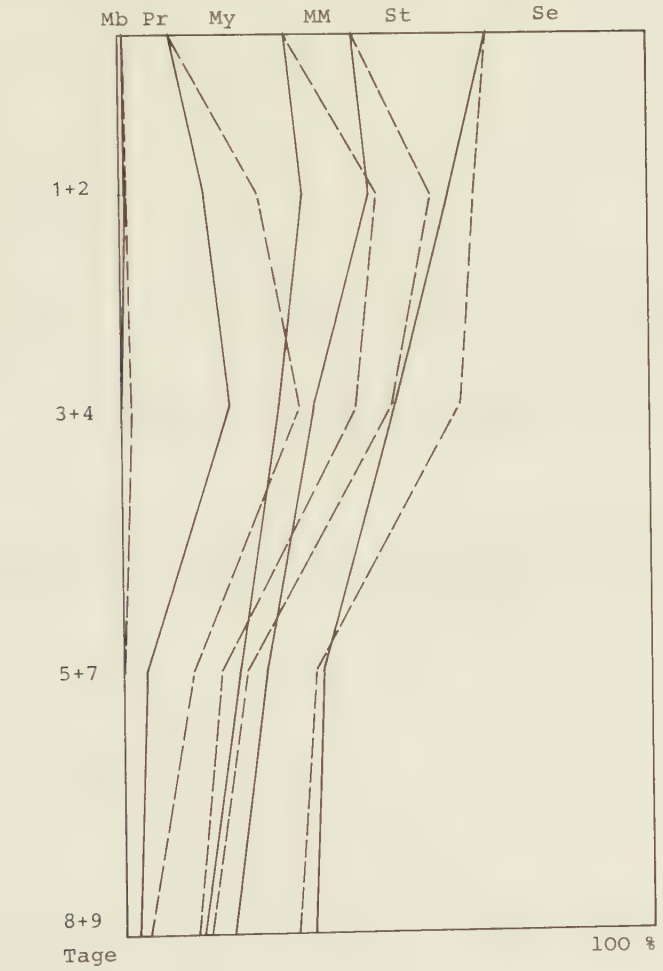


Abbildung 15:
Mittelwertreifungskurve der Granulopoese



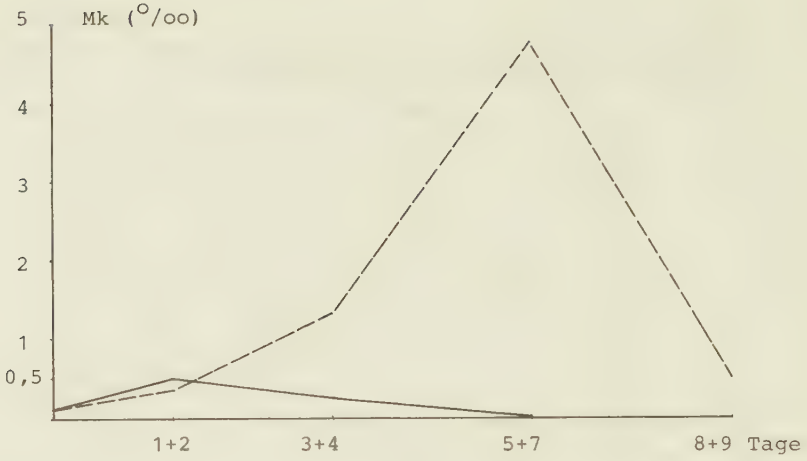


Abbildung 16: Zusammenfassung der Megakaryopoese

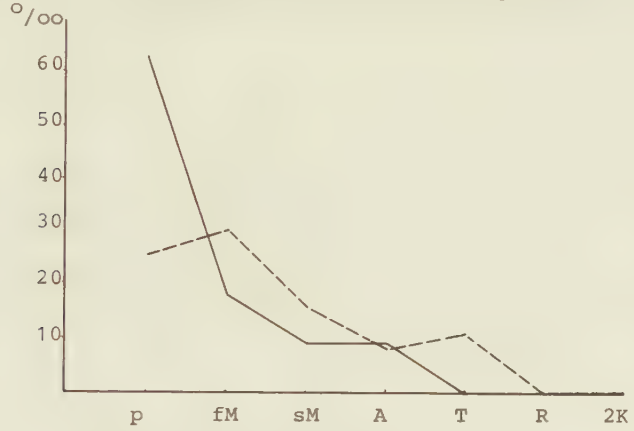
Abbildung 17: Zusammenfassung der Megakaryopoese

Kontrolle ————————

Zusatz --------

Abbildung 18:

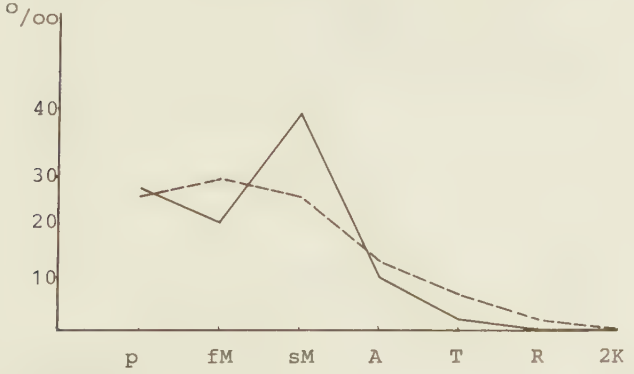
Mittlere karyologische Kurve der Erythropoese



prozentuale Mitosephasenverteilung

Abbildung 19:

Mittlere karyologische Kurve der Granulopoese



Kontrolle ————

Zusatz --------

Abbildung 20:

Mittlere Kurve der G/E - Indices

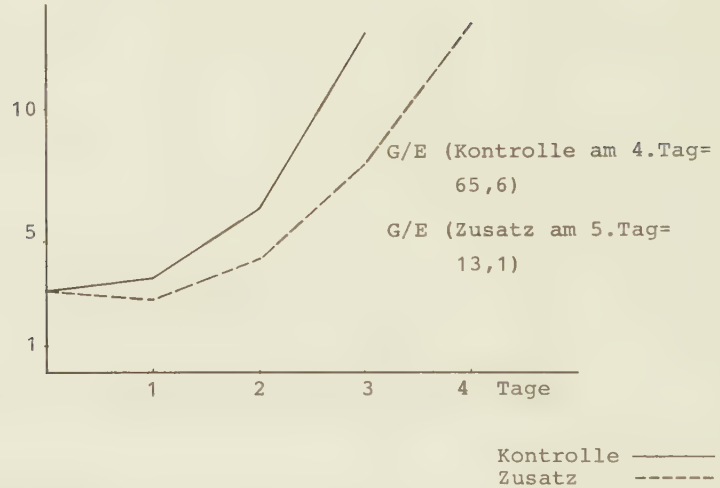


Abbildung 21:

Zusammenfassung der Megakaryopoese

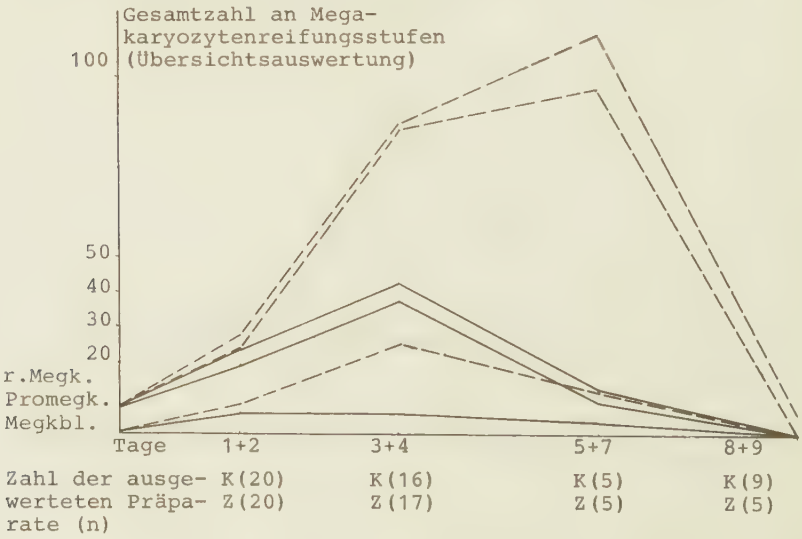


Tabelle 26: Signifikanzberechnung der Mitoseindices der Erythropoese aller fünf Versuche (1. + 2. und 3. + 4. Kulturtag werden jeweils zusammengefaßt).

1. + 2. Tag:

	B		$(B-E)^2/E$	
	Mitosen	teil. Zellen	Mitosen	Mitose-index (‰)
K	11	1210	5,82	9,1
Z	54	2264	3,07	23,9

$\chi^2 = 8,89$; $p < 0,01$

3. + 4. Tag:

	B		$(B-E)^2/E$	
	Mitosen	teil. Zellen	Mitosen	Mitose-index (‰)
K	0	213	1,85	0
Z	8	702	0,56	11,4

$\chi^2 = 2,41$; $p > 0,01$

An den folgenden Kulturtagen finden sich keine Mitosen der roten Reihe mehr.

Tabelle 27: Signifikanzberechnung der Mitoseindices der Granulopoese aller fünf Versuche. (1. + 2., 3. + 4. und 5. + 7. Kulturtag werden zusammengefaßt).

1. + 2. Tag:

	B		$(B-E)^2/E$	
	Mitosen	teil. Zellen	Mitosen	Mitose-index (°/oo)
K	24	4604	4,17	5,2
Z	54	5288	3,62	10,2

$\chi^2 = 7,79$; $p < 0,01$

3. + 4. Tag:

	B		$(B-E)^2/E$	
	Mitosen	teil. Zellen	Mitosen	Mitose-index (°/oo)
K	22	3205	11,67	6,9
Z	88	4648	8,05	18,9

$\chi^2 = 19,72$; $p < 0,01$

5. + 7. Tag:

	B		$(B-E)^2/E$	
	Mitosen	teil. Zellen	Mitosen	Mitose-index (°/oo)
K	3	969	0,72	3,1
Z	6	817	0,86	7,3

Nach dem 7. Kulturtag finden sich bei keinem der Versuche mehr Mitosen der weißen Reihe.

$\chi^2 = 1,58$; $p > 0,01$

Tabelle 28: Zusammenfassung der Megakaryozytenauswertung aller fünf Versuche (eingeteilt in 1. + 2., 3. + 4., 5. + 7. und 8. + 9. Kulturtag)

	K	Z	K	Z
	Mk(°/oo)		Mk pro Präparat(Übersicht)	
1. + 2. Tag	0,5	0,36	1,1	1,4
3. + 4. Tag	0,25	1,33	2,7	5,1
5. + 7. Tag	0	4,75	2,6	22,6
8. + 9. Tag	0	0,5	0,0	1,2

Die Angabe der Megakaryozyten in Promille (Mk °/oo) wird gewonnen durch Auswertung von jeweils 2000 Knochenmarkszellen zu einem bestimmten Zeitpunkt und Zusammenfassung der Ergebnisse entsprechend den angegebenen Intervallen.

Die durchschnittliche Zahl von Megakaryozyten pro Präparat (Übersicht) ist der Quotient aus der durch Übersichtsauswertung ermittelten Gesamtzahl von Mk durch die Zahl der auswertbaren Präparate zu einem bestimmten Zeitpunkt.

Tabelle 29: Zusammenfassung der Reifestufen der Megakaryopoese aller fünf Versuche (eingeteilt in 1.+2., 3.+4., 5.+7. und 8.+9.Kulturtag)

	Kontrolle		
	Megakaryoblasten	Promegakaryozyten	Megakaryozyten
	pro Präparat (in Klammern Prozentangabe)		
1.+2.Tag	0,3 (27)	0,6 (55)	0,2 (18)
3.+4.Tag	0,4 (15)	2,0 (74)	0,3 (11)
5.+7.Tag	0,8 (31)	1,0 (38)	0,8 (31)
8.+9.Tag	0	0	0

	Zusatz		
	Megakaryoblasten	Promegakaryozyten	Megakaryozyten
	pro Präparat (in Klammern Prozentangabe)		
1.+2.Tag	0,4 (29)	0,8 (57)	0,2 (14)
3.+4.Tag	1,5 (29)	3,5 (69)	0,1 (2)
5.+7.Tag	2,2 (10)	17,4 (77)	3,0 (13)
8.+9.Tag	0	0	1,2 (100)

VI. DISKUSSION

Zahlreiche Untersucher konnten mit Hilfe unterschiedlicher Versuchsmethoden bei Labortieren nach Induktion einer Thrombozytose durch Plättchentransfusion eine Suppression der Megakaryo- bzw. Thrombopoese nachweisen. Sie fanden eine Abnahme von Zahl (11, 32, 75, 79), Volumen (11), Größe (32, 79) und Ploidie (79) der Megakaryozyten, eine Verminderung der SAChE + Zellen (58) sowie eine spätere Abnahme der peripheren Plättchenzahl (58, 75) und der Radioisotopenaufnahme in Thrombozyten (34, 90). Diese Ergebnisse sind vor dem Hintergrund der beschriebenen negativen Feedbackkontrolle der Thrombopoeseregulation ohne weiteres verständlich.

Durch die vorliegende Arbeit sollte nun der Einfluß des Serums einer Patientin mit einer Thrombozythämie auf die Zellsysteme der roten, weißen und insbesondere die Megakaryozytenreihe untersucht werden.
Um unsere Ergebnisse besser mit den in der Literatur angegebenen vergleichen zu können, muß die in der Einleitung beschriebene Unterscheidung zwischen primärer Thrombozythämie (PT) und reaktiver Thrombozytose (RT) berücksichtigt werden. Der Knochenmarkbefund bei RT ist charakterisiert durch eine erhöhte Zahl von Mk bei erniedrigtem mittlerem Zellvolumen der Megakaryozyten (12, 35). Die ursächliche Beteiligung eines Stimulationsfaktors erscheint möglich.

Bei der PT finden sich im Knochenmark erhöhte Mk-Zahlen und ein inadäquat erhöhtes mittleres Mk-Volumen (29, 35); inadäquat deswegen, weil bei intaktem Regelkreis eine inverse Relation zwischen Plättchenzahl und mittlerem Mk-Zellvolumen besteht. Wegen der angeschuldigten autonomen Proliferationsstörung der Stammzelle wird von einigen Autoren bei der PT keine Erhöhung, sondern eher eine Verminderung der thrombopoesestimulierenden Faktoren angenommen (27, 29, 30).

Nach den oben gemachten Ausführungen würde man nun bei der Zugabe von Serum unserer Patientin mit einer Thrombozythämie im Rahmen eines myeloproliferativen Syndroms zur Kultur mit normalen menschlichen Knochenmarkzellen eine Erniedrigung der Mk-Zahlen erwarten. Um so erstaunlicher ist das Ergebnis, nach dem bei T.-Serumzusatz ab dem 3. + 4. Versuchstag mit 1,3 °/oo gegen 0,2 °/oo und am 5. + 7. Tag mit 4,7 °/oo gegen 0 °/oo der Anteil von Megakaryozyten an der Gesamtzellzahl deutlich höher ist als bei den Kontrollen. Bei der Übersichtsauswertung finden sich nach T.-Serumzusatz gegenüber den Kontrollen am 3. + 4. Tag durchschnittlich 5,1 gegen 2,7 und am 5. + 7. Tag durchschnittlich 22,6 gegen 2,6 Megakaryozyten pro Präparat. Am 1. + 2. Tag ist der Unterschied zwischen Kontrolle und Zusatz wegen der von den Mk benötigten Reifungszeit noch gering. Nach dem 7. Kulturtag gilt das gleiche wegen der bereits eingesetzten natürlichen Absterbeprozesse in der Zellkultur mit insgesamt nur noch relativ wenigen Zellen. Wenngleich bei der Übersichtsauswertung wegen der unterschiedlichen Gesamtzellzahl auf den verschiedenen ausgewerteten Präparaten keine statistisch exakte Vergleichbarkeit zwischen den Mk-Zahlen bei Kontrolle und Zusatz möglich ist, zeichnet sich doch ein eindeutiger Trend ab. Betrachtet man nun die Verteilung der drei Reifestufen der Megakaryopoese, so wird der oben beschriebene Unterschied zwischen Zusatz und Kontrolle am 3. + 4. Tag vorwiegend durch die Megakaryoblasten (durchschnittlich 1,5 gegen 0,4 Zellen pro Präparat) und am 5. + 7. Tag durch die Promegakaryozyten (durchschnittlich 17,4 gegen 1,0 Zellen pro Präparat) bestimmt. Ursache dieses Anstiegs der Häufigkeit von Megakaryopoesezellen muß - da sich lichtmikroskopisch identifizierbare Reifungsstufen nicht mehr teilen können (55, 83) - eine Vermehrung von frühen Vorstufen mit anschließender beschleunigter Überführung in die verschiedenen morphologisch erkennbaren Formen sein. Unser Ergebnis kann somit als Thrombopoetineffekt interpretiert werden, da TPO nach dem in der Einleitung gesagten, zunächst zu einer Vermehrung von kleinen

unreifen Mk (1, 41, 44, 59, 76) und schließlich über eine Beeinflussung der Reifungs- und Differenzierungsschritte wie Zunahme des Endomitoseindexes und der Ploidie (32, 33, 53, 76) und Zunahme der Mk-Größe (21, 32, 68, 76) zu dem auch bei uns beobachteten Anstieg der Gesamt-Mk-Zahl (11, 33, 68) führt. In vivo-Versuche zeigen, daß die Vermehrung von kleinen unreifen Mk (SAChE + -Zellen) nach TPO-Einfluß bei der Maus mehrere Stunden dauert (41). Meg-CSF-Einwirkung hingegen führt bei der Maus erst nach einigen Tagen (11) zu einer vermehrten Zellteilung der determinierten Stammzelle mit Zunahme der CFU-M (39) und ist ohne Einfluß auf die zusätzlich noch Zeit erfordernden Reifungs- und Differenzierungsschritte der Megakaryopoese (siehe Einleitung). Sowohl vom zeitlichen Ablauf als auch von der Wirkungsweise her, ist somit die in unserem Versuch beobachtete Wirkung des Thrombozythämieserums eher auf einen vermehrten Gehalt an TPO als auf Meg-CSF zurückzuführen.

Unser Nachweis einer megakaryozytopoese - bzw. thrombopoesestimulierenden Aktivität im Thrombozythämieserum steht im Einklang mit einem Versuch von Kelemen (46), der nach Gabe von Serum zweier Patienten mit einem myeloproliferativen Syndrom (MPS) und Thrombozytenzahlen zwischen 1 und 2 Millionen (keine Angabe zum roten BB) bei Mäusen erhöhte Plättchenzahlen feststellte. Linman (57) verabreichte Plasma von Patienten mit Thrombozythämie im Rahmen eines MPS (Thrombozytenzahlen zwischen 798000 und 6 Millionen, normales rotes BB) an Ratten und erzielte ebenfalls signifikante Anstiege der Thrombozytenzahlen. Zu dem gleichen Ergebnis kam Mc Donald (65) bei Verwendung von Urin thrombozytotischer Patienten (2 MPS, 1 unbekannte Genese, keine Angaben zur Plättchenzahl und zum roten BB) sowohl bei Auswertung der peripheren Plättchenzahl als auch im Radioisotopenassay. Reed (85) wies eine thrombopoetische Aktivität im Plasma von Patienten mit PT, jedoch nicht bei RT nach. Shreiner (92) legte die umfangreichste Untersuchung zu diesem

Thema vor und fand mit Hilfe des Radioisotopenassays bei 53 % von 17 Patienten (4 MPS, 13 RT, Plättchenzahlen zwischen 441000 und 1,2 Millionen, keine Angaben zum roten BB) im Plasma eine thrombopoesestimulierende Wirkung. Zwischen PT und RT bestand kein Unterschied. Er vermutet als zumindest einen der pathogenetisch bedeutsamen Faktoren für das Zustandekommen von Thrombozytosen - ohne zwischen RT und PT zu unterscheiden - eine Störung des Gleichgewichts zwischen Stimulatoren und einem hypothetischen Inhibitor, der im Falle einer Erniedrigung in diesem Assay nicht nachgewiesen werden konnte.
Andere Autoren jedoch konnten in ihren Thrombozytoseseren keine stimulierende Wirkung auf die Thrombo- bzw. Megakaryopoese nachweisen. Penington (81) fand im Serum von drei Patienten mit PT im Radioisotopenassay keine TPO-Aktivität. Im klonalen in-vitro-assay konnten Hoffman (39) bei Zugabe von 11 Patientenseren mit einer Thrombozytose (6 MPS, 3 PT, 2 RT bei Anämie; Plättchenzahlen 600 000 bis 1,931 Millionen) und Gerwitz (29) bei Zugabe von 14 Thrombozytoseseren (7 PT, 7 RT; Plättchenzahlen zwischen 400 000 und 1,8 Millionen) kein Wachstum von CFU-M-Kolonien und damit keinen Meg-CSF-Effekt beobachten.

Da sich die Wirkung unseres Serums auf die Megakaryopoese nicht schlüssig mit dem zur Zeit allgemein akzeptierten Zwei-Faktoren-Regulationsmodell erklären läßt (siehe Seite 9 oben), muß auch noch die erhebliche Anämie unserer Patientin mit Hb-Werten zwischen 6,9 g% und 8,3 g% zum Zeitpunkt der Gewinnung des Thrombozythämieserums berücksichtigt werden.
Die klinische Beobachtung, daß Anämien relativ häufig mit erhöhten Thrombozytenzahlen vergesellschaftet sind (30, 38, 63, 93) führte schon früh zu der Vermutung, daß ein bei diesen Zuständen erhöhter Erythropoetin-(EPO)-Spiegel in die Regulation der Thrombopoese eingreift. Die zur Klärung dieses Problems durchgeführten Untersuchungen führten zu unterschied-

lichen Ergebnissen.

Ein Teil von Autoren konnte keine thrombopoesestimulierende Wirkung von EPO und Anämieseren nachweisen (4, 19, 53, 60, 61, 99). Andere Untersucher hingegen fanden unter dem Einfluß von EPO im in-vitro-clonal-Assay eine Zunahme von CFU-M (28, 45, 70, 98), im Radioisotopenassay eine erhöhte Aufnahme von ^{75}SeM in Plättchen (25, 67, 91), sowie nach Induktion einer akuten Anämie beim Versuchstier einen Anstieg von peripheren Plättchenzahlen (13, 42) und der unreifen Mk (42). Die Vermutung, daß die beschriebenen EPO-Effekte durch eine Verunreinigung mit TPO oder Meg-CSF verursacht seien, konnte Kawakita (45) widerlegen, der auch nach Gabe von hochgereinigtem EPO eine verstärkte Koloniebildung von Megakaryozyten im klonalen in-vitro-Assay feststellte.

Eine mögliche Erklärung für den Einfluß von EPO auf die Megakaryopoese liefert die Rezeptortheorie von Baxter (3, 53). Danach kann sich ein Hormon, das in hoher Konzentration vorliegt, an nicht komplementäre Rezeptorstellen eines anderen Hormons binden, diese Rezeptorstellen aktivieren und dadurch die Wirkung dieses anderen Hormons imitieren.

Dies ist in unserem konkreten Fall deshalb vorstellbar, weil TPO und EPO große Ähnlichkeiten hinsichtlich ihrer chemischen Struktur besitzen (24, 51). Ein weiteres Argument für die genannte Hypothese ist die Beobachtung, daß die Erythropoetinwirkung auf die Thrombo- bzw. Megakaryopoese nur bei relativ hohen Dosen auftritt (25, 28, 67). Umgekehrt konnte durch Serum mit hohem TPO-Gehalt auch eine Stimulierung der roten Reihe bewirkt werden (25).

Eine andere Hypothese besagt, daß durch EPO Zellen stimuliert werden - zum Beispiel T-Lymphozyten oder Makrophagen - die daraufhin Meg-CSF freisetzen (45). Von Shreiner (91) wird ein potenzierender Effekt von Erythropoetin auf TPO angenommen.

Der anzunehmende erhöhte EPO-Spiegel unseres Versuchsserums

führt gegenüber den Kontrollen zu höheren roten Mitose-Indices mit 23,9 °/oo gegen 9,1 °/oo am 1. + 2. Tag, 11,4 °/oo gegen 0 °/oo am 3. + 4. Versuchstag und zu einer signifikanten Vermehrung teilungsfähiger Erythroblasten in der Reifungskurve, also zu einer vermehrten Proliferation. Bei der weißen Reihe wird vom ersten bis vierten Versuchstag ein deutlich vermehrter Anteil von Granuloblasten sowie eine signifikant gesteigerte Mitosehäufigkeit bei unwesentlich veränderter karyologischer Kurve durch Gabe unseres Serums bewirkt. Dieses Ergebnis einer gesteigerten Proliferation der roten und weißen Reihe bei Zugabe von Anämieserum steht in Einklang mit früheren Arbeiten von Stockhorst (96), v. Radnoth (100) und Saidi (88), die die gleiche Versuchsmethode verwendeten.

Für die in unserem Versuch beobachtete Stimulierung der Megakaryopoese kommen ursächlich am ehesten TPO und/oder EPO in Frage. Eine sichere Beurteilung darüber, welcher in dem Thrombozythämieserum enthaltene Stimulationsfaktor den beobachteten Einfluß auf die Megakaryopoese bewirkt wird nur möglich sein, wenn bei Anwendung der gleichen Kulturmethode der Einfluß von gereinigtem TPO, Meg-CSF und EPO auf die Verteilung und das zeitliche Auftreten der Mk-Reifestufen bekannt ist. Jackson (42) schlägt vor, daß Serum das auf seine thrombopoesestimulierende Aktivität hin untersucht wird, nicht von Patienten mit erniedrigten Hämatokritwerten gewonnen werden sollte.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Unter Anwendung der Suspensionskulturmethode wurde in der vorliegenden Arbeit die Einwirkung von Serum einer Patientin mit Thrombozythämie auf die Proliferation von Knochenmarkzellen während 3 - 11 Tagen in vitro untersucht. Dabei wurden fünf Sternalpunktate von Patienten mit weitgehend normalem Knochenmarkbefund und AB-Plasma als Kontrollzusatz verwendet. Von diesen Kulturen wurden Ausstriche angefertigt und insgesamt 84000 Zellen differenziert. Mitose- und G/E-Indices wurden ermittelt, Reifungs- und karyologische Kurven angefertigt und statistisch mit dem χ^2-Test geprüft.

Bei der Megakaryopoese fand sich sowohl bei Übersichtsauswertung als auch bei Differenzierung von jeweils 2000 Zellen pro Präparat vom dritten bis siebten Kulturtag bei Thrombozythämieserumzusatz gegenüber den Kontrollen ein deutlich vermehrtes Vorkommen von Zellen dieser Klasse.

In der weißen Reihe war nach T.-Serumzusatz bis zum vierten Kulturtag ein vermehrter Granuloblastenanteil und bis zum siebten Tag eine Erhöhung der Mitoseindices als Ausdruck einer stimulierten Proliferation nachweisbar. Auch bei der Erythropoese fand sich bis zum vierten Tag nach Zusatz des Versuchsserums eine Vermehrung des Anteils der teilungsfähigen Zellen und eine Erhöhung der Mitoseindices.

Wegen der erheblichen Anämie der Spenderin des Thrombozythämie-Serums müssen als Ursache der beobachteten Stimulierung der drei genannten Zellreihen neben thrombo- bzw. megakaryopoesestimulierenden auch erythropoesestimulierende Regulationsfaktoren diskutiert werden.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. ADAMS, W.H., LIU, Y.K., SULLIVAN, L.W.
Humoral regulation of thrombopoiesis in man.
J. Lab. clin. Med. 91 (1978), 141.

2. ADAMSON, J.W., FIALKOW, P.J.
The pathogenesis of myeloproliferative syndromes.
Brit. J. Haemat. 38 (1978), 299.

3. BAXTER, J.D., FUNDER, J.W.
Hormone receptors.
New Engl. J. Med. 301 (1979), 1149.

4. BIRKS, J.W., KLASSEN, L.W., GURNEY, C.W.
Hypoxia-induced thrombocytopenia in mice.
J. Lab. clin. Med. 86 (1975), 230.

5. BOLL, I.
Granulozytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1966).

6. BOLL, I., MERSCH, G.
Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro.
Blut 17 (1968), 193.

7. BOLL, I., MERSCH, G.
Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulozytopoese in vitro.
Blut 19 (1969), 257.

8. BOLL, I., COLLMANN, H., AUST, C.

Quantitative Bestimmung der Proliferationskinetik des menschlichen Knochenmarks während drei Kulturtagen.

Blut 31 (1975), 201.

9. BOLL, I.

Zytologische Knochenmarkdiagnostik.

Zweite, neubearbeitete Auflage; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1980).

10. BURKHARDT, R., KRONSEDER, A.

Megakaryozytäre Myelose - Ursache der "idiopathischen" Thrombozythämie.

Fortschr. Med. 19 (1977), 1261.

11. BURSTEIN, S.A., ADAMSON, J.W., ERB, S.K., HARKER, L.A.

Megakaryocytopoiesis in the mouse: Response to varying platelt demand.

J. cell. Physiol. 109 (1981), 333.

12. BURSTEIN, S.A., HARKER, L.A.

Control of platelet production.

Clin. Haemat. 12 (1983), 3.

13. CHOI, S.I., SIMONE, J.V.

Platelet production in experimental iron deficiency anemia.

Blood 42 (1973), 219.

14. CLIFT, R., Mc DONALD, T.P.

A comparison of [^{35}S] sodium sulfate and [^{75}Se] selenomethionine as platelet labels for the assay of thrombopoietin.

Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 162 (1979), 380.

15. COOPER, G.W., COOPER, B., CHANG, C.Y.

Demonstration of a circulating factor regulating blood platelet production using ^{35}S-sulfate in rats and mice.

Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 134 (1970), 1123.

16. DASSIN, E., BOUREBIA, J., NAJEAN, Y., ROSSET, A.M.
Partial purification of a thrombocytopoiesis stimulating factor present in the serum of thrombocytopenic rats.
Acta haemat. 69 (1983), 249.

17. DAVIS, R.B., THEOLOGIDES, A., KENNEDY, B.J.
Comparative studies of blood coagulation and platelet aggregation in patients with cancer and nonmalignant diseases.
Ann. intern. Med. 71 (1969), 67.

18. DAVIS, R.B., ROSS, A.O.M.
Thrombocytosis and thrombocythemia: the laboratory and clinical significance of an elevated platelet count.
Amer. J. clin. Path. 59 (1973), 243.

19. DE GABRIELE, G., PENINGTON, D.G.
Physiology of the regulation of platelet production.
Brit. J. Haemat. 13 (1967), 202.

20. DE GABRIELE, G., PENINGTON, D.G.
Regulation of platelet production: Thrombopoietin.
Brit. J. Haemat. 13 (1967), 210.

21. EBBE, S., PHALEN, E.
Regulation of megakaryocytes in W/W^{V} mice.
J. cell. Physiol. 96 (1978), 73.

22. ENOMOTO, K., KAWAKITA, M., KISHIMOTO, S., KATAYAMA, N.
Thrombopoiesis and megakaryocyte colony stimulating factor in the urine of patients with aplastic anemia.
Brit. J. Haemat. 45 (1980), 551.

23. EVATT, B.L., LEVIN, J.
Measurement of thrombopoiesis in rabbits using ^{75}selenomethionine.
J. clin. Invest. 48 (1969), 1615.

24. EVATT, B.L., SHREINER, D.P., LEVIN, J.

Thrombopoietic activity of fractions of rabbit plasma: Studies in rabbits and mice.

J. Lab. clin. Med. 83 (1974), 364.

25. EVATT, B.L., SPIVAK, J.L., LEVIN, J.

Relationships between thrombopoiesis and erythropoiesis: with studies of the effects of preparations of thrombopoietin and erythropoietin.

Blood 48 (1976), 547.

26. EVATT, B.L., LEVIN, J., ALGAZY, K.M.

Partial purification of thrombopoietin from the plasma of thrombocytopenic rabbits.

Blood 54 (1979), 377.

27. FIALKOW, P.J., FAGUET, G.B., JACOBSEN, R.J., VAIDYA, K.

Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell.

Blood 58 (1981), 916.

28. FREEDMAN, M.H., Mc DONALD, T.P., SAUNDERS, E.F.

Differentiation of murine marrow megakaryocyte progenitors (CFUm): humoral control in vitro.

CELL Tiss. Kinet. 14 (1981), 53.

29. GERWITZ, A.M., BRUNO, E., ELWELL, Y., HOFFMAN, R.

In vitro studies of megakaryocytopoiesis in thrombocytotic disorders of man.

Blood 61 (1983), 384.

30. GROSS, S., KEEFER, V., LIEBMAN, J.

The platelets in cyanotic congenital heart disease.

Pediatrics 42 (1968), 651.

31. HARKER, L.A.

Megakaryocyte quantitation.

J. clin. Invest. 47 (1968), 452.

32. HARKER, L.A.
Kinetics of thrombopoiesis.
J. clin. Invest. 47 (1968), 458.

33. HARKER, L.A., FINCH, C.A.
Thrombokinetics in man.
J. clin. Invest. 48 (1969), 963.

34. HARKER, L.A.
Regulation of thrombopoiesis.
Amer. J. Physiol. 218 (1970), 1376.

35. HARKER, L.A.
Control of platelet production.
Ann. Rev. Med. 25 (1974), 383.

36. HAYES, D.M., SPURR, C.L., HUTAFF, L.W., SHEETS, J.A.
Postsplenectomy thrombocytosis.
Ann. Intern. Med. 58 (1963), 259.

37. HECKNER, F.
Praktikum der mikroskopischen Hämatologie.
Urban & Schwarzenberg-Verlag München 1981.

38. HIRSH, J., DACIE, J.V.
Persistent post-splenectomy thrombocytosis and thromboembolism: A consequence of continuing anaemia.
Brit. J. Haemat. 12 (1966), 44.

39. HOFFMAN, R., MAZUR, E., BRUNO, E., FLOYD, V.
Assay of an activity in the serum of patients with disorders of thrombopoiesis that stimulates formation of megakaryocytic colonies.
New Engl. J. Med. 305 (1981), 533.

40. HOFFMAN, R., BRUNO, E., ELWELL, J., MAZUR, E., et al.
Acquired amegakaryocytic thrombocytopenic purpura: A syndrome of diverse etiologies.
Blood 60 (1982), 1173.

41. JACKSON, C.W.
Cholinesterase as a possible marker for early cells of the megakaryocytic series.
Blood 42 (1973), 413.

42. JACKSON, C.W., SIMONE, J.V., EDWARDS, C.C.
The relationship of anemia and thrombocytosis.
J. Lab. clin. Med. 84 (1974), 357.

43. JAMSHIDI, K., ANSARI, A., WINDSCHITL, H.E., SWAIM, W.R.
Primary thrombocythemia.
Geriatrics 28 (1973), 121.

44. KALMAZ, G.D., Mc DONALD, T.P.
Effects of antiplatelet serum and thrombopoietin on the percentage of small acethylcholinesterase-positive cells in bone marrow of mice.
Exp. Hemat. 9 (1981), 1002.

45. KAWAKITA, M., OGAWA, M., GOLDWASSER, E., MIYAKE, T.
Characterization of human megakaryocyte colony-stimulating factor in the urinary extracts from patients with aplastic anemia and idiopathic thrombocytopenic purpura.
Blood 61 (1983), 556.

46. KELEMEN, E., CSERHATI, I., TANOS, B.
Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera.
Acta haemat. 20 (1958), 350.

47. KELEMEN, E., LEHOCZKY, D., CSERHATI, I., KRISZA, F., RAK,K.
Demonstrability of a serum factor inducing thrombocytosis prior to acute rises of platelets in mice and men.
Acta haemat. 29 (1963), 16.

48. KRUG, K., ROHRBERG, R., WESSEL, H.
Megakaryozytäre Pseudomyelose mit hochgradiger Thrombozytose.
Z. ges. inn. Med. 36 (1981), 734.

49. LEVIN, J., CONLEY, C.L.
Thrombocytosis associated with malignant disease.
Arch. intern. Med. 114 (1964), 497.

50. LEVIN, J.
Thrombopoiesis and thrombopoietin.
Hemopoietic Cellular Proliferation. Frederick Stohlmann, Jr., Editor, Grune & Stratton, Inc. New York, 1970.

51. LEVIN, J., EVATT, B.L.
Humoral control of thrombopoiesis.
Blood Cells 5 (1979), 105.

52. LEVIN, J., METCALF, D.
The effects of acute thrombocytopenia on megakaryocyte-CFC and granulocyte - macrophage - CFC in mice. Studies of bone marrow and spleen.
Blood 56 (1980), 274.

53. LEVIN, J., LEVIN, F.C., HULL, D.F., PENINGTON, D.G.
The effects of thrombopoietin on megakaryocyte - CFC, megakaryocytes, and thrombopoiesis: with studies of ploidity and platelet size.
Blood 60 (1982), 989.

54. LEVIN, J.
Murine megakaryocytopoiesis in vitro: An analysis of culture systems used for the study of megakaryocyte colony-forming cells and of the characteristics of megakaryocyte colonies.
Blood 61 (1983), 617.

55. LEVINE, R.F.
The origin, development and regulation of megakaryocytes.
Brit. J. Haemat. 52 (1982), 173.

56. LINMAN, J.W., PIERRE, R.V.
Thrombocytosis-promoting activity of normal plasma.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 110 (1962), 463.

57. LINMAN, J.W., PIERRE, R.V.
Studies on thrombopoiesis. III. Thrombocytosis-promoting effects of "thrombocythemic" and "polycythemic" plasmas.
J. Lab. clin. Med. 62 (1963), 374.

58. LONG, M.W., HENRY, R.L.
Thrombocytosis-induced suppression of small acethyl-cholinesterase-positive cells in bone marrow of rats.
Blood 54 (1979), 1338.

59. LONG, M.W., WILLIAMS, N., EBBE, S.
Immature megakaryocytes in the mouse: physical characteristics, cell cycle status, and in vitro responsiveness to thrombopoietic stimulatory factor.
Blood 59 (1982), 569.

60. MAZUR, E.M., HOFFMAN, R., CHASIS, J., MARCHESI, S.
Immunofluorescent identification of human megakaryocyte colonies using an antiplatelet glycoprotein antiserum.
Blood 57 (1981), 277.

61. MAZUR, E.M., HOFFMAN, R., BRUNO, E.
Regulation of human megakaryocytopoiesis. An in vitro analysis.
J. clin. Invest. 68 (1981), 733.

62. Mc CLURE, P.D., INGRAM, G.I.C., STACEY, R.S.
Platelet function tests in thrombocythemia and thrombocytosis.
Brit. J. Haemat. 12 (1966), 478.

63. Mc CLURE, P.D., CHOI, S.I.

Thrombopoietin and erythropoietin levels in idiopathic thrombocytopenic purpura and irondeficiency anemia.

Brit. J. Haemat. 15 (1968), 351.

64. Mc DONALD, T.P., CLIFT, R., LANGE, R.D., NOLAN, C., et al.

Thrombopoietin production by human embryonic kidney cells in culture.

J. Lab. clin. Med. 85 (1975), 59.

65. Mc DONALD, T.P.

Assay of thrombopoietin utilizing human sera and urine fractions.

Biochem. Med. 13 (1975), 101.

66. Mc DONALD, T.P.

Role of the kidneys in thrombopoietin production.

Exp. Hemat. 4 (1976), 27.

67. Mc DONALD, T.P., CLIFT, R.

Effects of thrombopoietin and erythropoietin on platelet production in rebound-thrombocytotic and normal mice.

Amer. J. Hemat. 6 (1979), 219.

68. Mc DONALD, T.P., KALMAZ, G.D.

Effects of thrombopoietin on the number and diameter of marrow megakaryocytes of mice.

Exp. Hemat. 11 (1983), 91.

69. Mc DONALD, T.P., KALMAZ, G.D.

Nephrectomy abolishes the increase in small acethylcholinesterase-positive immature rat megakaryocytes induced by acute thrombocytopenia.

Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 174 (1983), 131.

70. Mc LEOD, D.L., SHREEVE, M.M., AXELRAD, A.A.

Induction of megakaryocyte colonies with platelet formation in vitro.

Nature (Lond.) 261 (1976), 492.

71. METCALF, D., Mc DONALD, H.R., ODARTCHENKO, N. et al.
Growth of mouse megakaryocyte colonies in vitro.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 72 (1975), 1744.

72. NAKEFF, A., ROOZENDAAL, K.J.
Thrombopoietin activity in mice following immune-induced thrombocytopenia.
Acta haemat. 54 (1975), 340.

73. NAKEFF, A., DANIELS-Mc QUEEN, S.
In vitro colony assay for a new class of megakaryocyte precursor: colony-forming unit megakaryocyte (CFU-M).
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 151 (1976), 587.

74. ODELL, T.T., Mc DONALD, T.P., DETWILER, T.C.
Stimulation of platelet production by serum of platelet-depleted rats.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 108 (1961), 428.

75. ODELL, T.T., JACKSON, C.W., REITER, R.S.
Depression of the megakaryocyte-platelet system in rats by transfusion of platelets.
Acta haemat. 38 (1967), 34.

76. ODELL, T.T., MURPHY, J.R., JACKSON, C.W.
Stimulation of megakaryocytopoiesis by acute thrombocytopenia in rats.
Blood 48 (1976), 765.

77. PENINGTON, D.G.
Studies of platelet production and sequestration in the experimental animal.
Proc. Roy. Soc. Med. 61 (1968), 601.

78. PENINGTON, D.G.
Assessment of platelet production with ^{75}Se selenomethionine.
Brit. med. J. 4 (1969), 782.

79. PENINGTON, D.G., OLSEN, T.E.
Megakaryocytes in states of altered platelet production. Cell numbers, size and DNA content.
Brit. J. Haemat. 18 (1970), 447.

80. PENINGTON, D.G.
Isotope bioassay for thrombopoietin.
Brit. med. J. 1 (1970), 606.

81. PENINGTON, D.G.
Assay of thrombopoietin in mice using ^{75}Se-methionine.
In Platelet Kinetics (J.M. Paulus ed.) p. 143, North Holland Publishing Co., Amsterdam. 1971.

82. PIERRE, R.V., LINMAN, J.W.
Studies on thrombopoiesis. IV. Thrombocytosis-promoting activity of normal urine.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 113 (1963), 398.

83. QUEIßER, W.
Das Knochenmark.
Georg-Thieme Verlag Stuttgart, (1978).

84. RATH, C.E., MAILLIARD, J.A., SCHREINER, G.E.
Bleeding tendency in uremia.
New. Engl. J. Med. 257 (1957), 808.

85. REED, R.E., PENNER, J.A.
Plasma thrombopoietic activity associated with disorders of platelet production.
Clin. Res. 22 (1974), 640 A (abstr.)

86. REICH, T.
Idee und Praxis der medizinischen Statistik.
Verlag Hans Huber, Bern und Stuttgart (1964).

87. RHYNER, K., BLÄTTLER, W., BAUER, W., BOLLINGER, A.

Die primäre Thrombozythämie: Klinik, Pathophysiologie und Therapiemöglichkeiten.

Schweiz. med. Wschr. 109 (1979), 467.

88. SAIDI, M.

Die Wirkung vom Serum eines Patienten nach Blutverlust und nach Bluttransfusionen auf das menschliche Knochenmark in vitro.

Dissertation, Berlin (1980).

89. SCHULMAN, I., ABILGAARD, C.F., CORNET, J. et al.

Studies on thrombopoiesis. II. An assay of human plasma thrombopoietic activity.

J. Pediat. 66 (1965), 604.

90. SHREINER, D.P., LEVIN, J.

Detection of thrombopoietic activity in plasma by stimulation of suppressed thrombopoiesis.

J. clin. Invest. 49 (1970), 1709.

91. SHREINER, D.P., LEVIN, J.

The effects of hemorrhage, hypoxia, and a preparation of erythropoietin on thrombopoiesis.

J. Lab. clin. Med. 88 (1976), 930.

92. SHREINER, D.P., WEINBERG, J., ENOCH, D.

Plasma thrombopoietic activity in humans with normal and abnormal platelet counts.

Blood 56 (1980), 183.

93. SIRI, W.E., VAN DYKE, D.C., WINCHELL, H.S. et al.

Early erythropoietin, blood, and physiological responses to severe hypoxia in man.

J. appl. Physiol. 21 (1966), 73.

94. SPECTOR, B.

In vivo transfer of a thrombopoietic factor.

Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 108 (1961), 146.

95. STEINBERG, B., CHENG, F.H.F., MARTIN, R.A., DIETZ, A.A.
Thrombocytic and thrombopenic factors in normal human serum.
Acta haemat. 33 (1965), 341.

96. STOCKHORST, H.U.
Die Wirkung von Serum nach großem Blutverlust auf die Erythro- und Granulopoese, dargestellt an Untersuchungen von menschlichen Knochenmarkkulturen.
Dissertation, Berlin (1974).

97. TRANUM, B.L., HAUT, A.
Thrombocytosis: platelet kinetics in neoplasia.
J. Lab. clin. Med. 84 (1974), 615.

98. VAINCHENKER, W., BOUGUET, J., GUICHARD, J. et al.
Megakaryocyte colony formation from human bone marrow precursors.
Blood 54 (1979), 940.

99. VAN DYKE, D.
Response of monkeys to erythropoietin of rabbit, sheep, and human origin.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 116 (1964), 171.

100. VON RADNOTH, S.B.
Der Einfluß von Erythropoietin auf menschliches Knochenmark in vitro.
Dissertation, Berlin (1972).

101. WILLIAMS, N., JACKSON, H.
Regulation of the proliferation of murine megakaryocyte progenitor cells by cell cycle.
Blood 52 (1978), 163.

102. WILLIAMS, N., Mc DONALD, T.P., RABELLINO, E.M.
Maturation and Regulation of megakaryopoiesis.
Blood Cells 5 (1979), 43.

103. WILLIAMS, N., EGER, R.R., JACKSON, H.M., NELSON, D.J.
Two-factor requirement for murine megakaryocyte colony formation.
J. cell. Physiol. 110 (1982), 101.

IX. GLOSSAR

A:	Anaphase
AB-Plasma:	Plasma von gesunden Blutspendern der Blutgruppe AB
AchE:	Acethylcholinesterase
APS:	Antiplättchenserum
bE:	basophiler Erythroblast
bSeg:	basophiler segmentkerniger Granulozyt
bMy:	basophiler Myelozyt
CFU-M:	colony forming unit megakaryocyte
eSeg:	eosinophiler segmentkerniger Granulozyt
eMy:	eosinophiler Myelozyt
EPO:	Erythropoetin
fM:	frühe Metaphase
G/E-Index:	Zahlenverhältnis von granulopoetischen zu erythropoetischen Zellen
K:	Kontrolle
Mb:	Myeloblast
Meg-CSF:	megakaryocyte colony-stimulating-factor
Megkbl.:	Megakaryoblast
Mk:	Megakaryozyt (ohne Kennzeichnung des jeweiligen Reifungsgrades)
MM:	Metamyelozyt
Mo:	Monozyt
MPS:	myeloproliferatives Syndrom
My:	Myelozyt
oE:	oxyphiler Erythroblast
P:	Prophase
pE:	polychromatischer Erythroblast
PE:	Proerythroblast
Pmo:	Promonozyt
Promegk.:	Promegakaryozyt
PT:	primäre Thrombozythämie; synonym wird in dieser Arbeit der Begriff Thrombozythämie verwendet
R:	Rekonstruktionsphase

rE:	reifer Erythroblast
r.Megk.:	reifer Megakaryozyt
rMi:	roter Mitoseindex
RT:	reaktive Thrombozytose
SaChE+ Zelle:	small acethylcholinesterase positive cell
Seg:	segmentkerniger Granulozyt
^{75}SeM:	radioaktiv markiertes Selenmethionin
sM:	späte Metaphase
St:	stabkerniger Granulozyt
T:	Telophase
Thrombo-zytose:	bei Verwendung dieses Begriffes ist allgemein eine Thrombozytenerhöhung ohne Berücksichtigung von Ätiologie oder Pathogenese gemeint
TPO:	Thrombopoetin
T.-Serum-zusatz:	Thrombozythämie-Serumzusatz
TSF:	thrombopoesis stimulating factor
wMi:	weißer Mitoseindex
Z:	Zusatz

Frau Prof. Dr. med. Irene Boll danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei meiner Arbeit.

LEBENSLAUF

Geboren am 23.8.1954 in Memmingen

1960 - 1964 Besuch der Volksschule in Memmingen

1964 - 1973 Besuch des Bernhard-Strigel-Gymnasiums in Memmingen mit Abitur im Juni 1973

WS 1973/74 und SS 1974 Biologiestudium in Konstanz

Dezember 1974 bis März 1976 Zivildienst als Krankenpflegehelfer im Stadtkrankenhaus Memmingen

SS 1976 bis WS 1977/78 Studium der Veterinärmedizin an der FU Berlin

März 1978 Physikum im Fach Veterinärmedizin

SS 1978 Zulassung als Quereinsteiger für das Studienfach Humanmedizin an der FU Berlin

September 1978 Physikum im Fach Humanmedizin

September 1979 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

September 1981 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Dezember 1982 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

29.12.1982 Erteilung der Approbation als Arzt von der Ärztekammer Berlin

Seit 1. März 1983 Assistenzarzt in der Neurochirurgischen Abteilung des Rudolf-Virchow-Krankenhauses bei Prof. Dr.med. E. Kazner